MIKROCHIMICA ACTA

HERAUSGEGEBEN VON / EDITORIAL BOARD / PUBLIÉ PAR
A. A. BENEDETTI-PICHLER - New York · G. BLIX - Uppsala
C. DUVAL - Paris · F. FEIGL - Rio de Janeiro · J. HEYROVSKÝ - Praha
P. L. KIRK - Berkeley · H. LIEB - Graz · F. SCHNEIDER - New York
R. STREBINGER - Wien · C. L. WILSON - Belfast
M. K. ZACHERL - Wien

MITHERAUSGEBER / ASSISTANT EDITORS / RÉDACTEURS ADJOINTS
E. ABRAHAMCZIK - Ludwigshafen/Rhein · H. K. ALBER - Philadelphia
R. BELCHER - Birmingham · N. D. CHERONIS - New York
F. HECHT - Wien · W. KIRSTEN - Uppsala · A. LACOURT - Bruxelles
W. C. McCRONE - Chicago · A. L. THOMPSON - Montreal
PH. W. WEST - Baton Rouge · M. L. WILLARD - State College

SCHRIFTLEITUNG / EDITORIAL OFFICE / RÉDACTEUR EN CHEF
M. K. ZACHERL - Wien

1953, VIERTES HEFT
MIT 17 TEXTABBILDUNGEN
ABGESCHLOSSEN AM 13. OKTOBER 1953

WIEN
SPRINGER-VERLAG
1953

Mikrochim. Acta

Die Zeitschrift

„Mikrochimica Acta"

erscheint zwanglos in Heften, die zu Jahresbänden von etwa 800 Seiten vereinigt werden. Der Preis eines Heftes richtet sich nach seinem Umfang und den jeweiligen Herstellungskosten.

Zur Veröffentlichung gelangen Originalarbeiten aus dem Gebiet der allgemeinen und angewandten Mikrochemie in deutscher, englischer und französischer Sprache, wenn sie nicht mehr als $1^1/_2$ Druckbogen umfassen. Die Reihenfolge der Veröffentlichung richtet sich im allgemeinen nach dem Datum des Eingangs der Manuskripte bei der Redaktion.

Für die Zeitschrift bestimmte Manuskripte aus USA. und Canada sind zu senden an:

Editors of „Mikrochimica Acta", Department of Chemistry, Queens College, Flushing, N. Y., USA. (Dr. A. A. Benedetti-Pichler and Dr. F. Schneider)

Sonstige Manuskripte in englischer Sprache sind zu senden an:

Dr. C. L. Wilson, Department of Chemistry, The Queen's University, Belfast

Manuskripte in französischer Sprache sind zu senden an:

Prof. Clément Duval, Laboratoire de Recherches micro-analytiques de l'E. N. S. C. P., 11, rue Pierre Curie, Paris, 5

Manuskripte in deutscher Sprache sind zu senden an:

Prof. Dr. M. K. Zacherl, Wien, I., Mölkerbastei 5

Geschäftliche Mitteilungen sind zu richten an:

Springer-Verlag, Wien, I., Mölkerbastei 5
Fernsprecher: U 26 5 60 Serie, Telegrammadresse: Springerbuch Wien

Grundsätzlich werden nur Arbeiten angenommen, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind; der Autor verpflichtet sich, diese auch nachträglich nicht anderweitig zu veröffentlichen. Mit der Annahme und Veröffentlichung des Manuskriptes geht das ausschließliche Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder auf den Verlag über. Es ist ferner ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages nicht gestattet, photographische Vervielfältigungen, Mikrofilme u. ä. von Heften der Zeitschrift, einzelnen Beiträgen oder von Teilen daraus herzustellen.

Fortsetzung auf der III. Umschlagseite

1953 4. Heft

Inhaltsverzeichnis

Seite

Lacourt, A., Gh. Sommereyns, C. Francotte et N. Delande. Microanalyse fonctionnelle organique basée sur la détermination des constantes physiques. Identification des acides aminés 305

Sommereyns, Gh. Microdétermination des constantes physiques des acides aminés 332

Flaschka, H., K. ter Haar und J. Bazen. Mikrotitrationen mit Äthylendiamintetraessigsäure. VIII. 345

Kainz, G. Mikrobestimmung primärer Aminogruppen in aliphatischen und aromatischen Verbindungen, in Aminosäuren und Peptiden, sowie in Carbonsäureamiden und Sulfonsäureamiden 349

Fischer, R. und M. S. Karawia. Zum Nachweis von Analgeticis und Alkaloiden mittels Tetraphenylbornatrium (Kalignost) und Nitrokörpern 366

Spitzy, H., H. Skrube und F. S. Sadek. Über die Anreicherung kleinster Mengen elementaren Jods und seine mikroanalytische Trennung von ionisiertem Jod 375

Fortsetzung auf der III. Umschlagseite

Département de Microchimie de l'Université libre de Bruxelles.

Microanalyse fonctionnelle organique basée sur la détermination des constantes physiques. Identification des acides aminés*.

Par

A. Lacourt, Gh. Sommereyns, C. Francotte et N. Delande**.

Avec 1 figure.

(Reçu le 29 juin 1953.)

L'identification des corps organiques repose sur la préparation de dérivés cristallisés caractéristiques dont on détermine la température de fusion. A l'échelle microchimique, la technique est la même. Le minimum de substance nécessaire pour la préparation d'un dérivé est de 50 mg. On peut dire que la microanalyse qualitative fonctionnelle est très en retard sur les autres techniques microanalytiques organiques.

Il existe des classes de composés chez lesquels la fonction est, soit inexistante, soit peu réactive[1]. Pour ceux-là, cette technique est peu efficace. Il en est d'autres qui sont trop fragiles pour supporter l'action des réactifs et du chauffage et qui pour cette raison se prêtent aussi mal à cette méthode d'identification par dérivés caractéristiques.

On sait d'autre part que la solubilité, la densité, l'indice de réfraction, la température de fusion, permettent d'identifier certains individus ou tout au moins, de fixer à quelle classe de composés organiques ils appartiennent. Les constantes physiques sont sensibles aux influences des structures chimiques et sont donc susceptibles de servir à l'identification de corps organiques. Les constantes physiques ont beaucoup servi à la recherche au cours de ces dernières années et notamment pour les besoins de la biochimie; il en est qui ont été mises au point à l'échelle micro et ultra microchimique. La précision avec laquelle la densité des corps est

* Ce travail a été subsidié par le *Fonds national de la recherche scientifique de Belgique.*

** *Mémoire de licence* en *Chimie* — juillet 1953, Faculté des Sciences, *Université* de *Bruxelles.*

déterminable par la technique de *Linderstrøm-Lang* est de loin supérieure à toutes les techniques macrochimiques: 2 unités de la 5e décimale.

Tout récemment, des perfectionnements microchimiques ont été apportés aux déterminations de l'indice de réfraction et surtout de la température de fusion[2] permettant l'analyse qualitative et quantitative de mélanges en se servant de ces constantes, sur une quantité de matière de l'ordre de un ou quelques cristaux. La faculté des substances de former des eutectiques caractéristiques, permet aussi de caractériser celles-ci avec certitude. Cette faculté est avantageuse dans le cas de substances altérables par le chauffage, pour lesquelles les données de température de fusion sont imprécises et qui forment des eutectiques fusibles bas. Les *acides aminés* sont dans ce cas. La littérature mentionne un grand nombre de dérivés de ces acides, mais la quantité de matière nécessaire pour leur préparation, l'incertitude du résultat et le prix élevé de ces produits rend la méthode d'identification, basée sur la préparation de dérivés, peu satisfaisante.

La chromatographie fractionne les acides aminés de milieux complexes, même sur de très minimes quantités, mais aucune méthode ne permet encore d'identifier ces fractions isolées.

La présente recherche a donc pour but de trouver une méthode d'identification des acides aminés cristallisés ou en solution en se basant sur des constantes physiques. Ce n'est pas seulement une méthode d'identification, c'est aussi une contribution originale à la détermination des constantes physiques des acides aminés à l'échelle microchimique et de ce fait une contribution à la microanalyse qualitative fonctionnelle en ce qui concerne ces substances. Il est certain, étant donné les résultats obtenus avec les acides aminés, que cette technique de microanalyse fonctionnelle peut être étendue à d'autres classes de composés, pour lesquelles les données sont absentes dans la littérature.

Considérant la fragilité au chauffage des acides aminés, les constantes physiques qui à leur égard sembleraient devoir être les plus intéressantes sont la densité, l'indice de réfraction, la solubilité, le pouvoir rotatoire.

Pour les deux dernières constantes, l'on trouve énormément de renseignements mais ceux-ci n'étant pas standardisés, il est impossible de les utiliser à des identifications. La densité a déjà été fixée pour 20 de ces acides cristallisés[7]. Trois seulement ont été examinés au point de vue de l'indice de réfraction.

Quant à la température de fusion de ces acides, leur imprécision ne s'améliore pas si l'on détermine celle-ci par les nouvelles techniques[4] ou si l'on passe par la sublimation.

Par contre, la fusion des eutectiques binaires de ces acides entre eux ou avec d'autres partenaires a été étudiée selon les techniques de *Kofler*[2] et comme ces mélanges fondent plus bas que chacun des partenaires

eutectiques, le début de la fusion eutectique se produit le plus souvent avec une grande netteté et une bonne reproductibilité, ce qui indique qu'à ce moment l'acide aminé impliqué dans le mélange eutectique n'a pas eu trop à souffrir du chauffage.

Certains de ces eutectiques fondent en dessous de 100°, mais il en est, que nous n'avons pas encore pu étudier, qui sont liquides à la température ordinaire. Ces eutectiques sont vraisemblablement les plus sûrs et leur valeur pour l'identification des acides aminés pourra être comparée à celle de la densité ou de l'indice.

Le présent travail présente donc un indiscutable intérêt d'actualité, en vue du contrôle qualitatif de pureté des acides aminés cristallisés à l'échelle microchimique, en vue du contrôle du travail chromatographique, et comme méthode microanalytique d'analyse fonctionnelle.

Méthode de travail et appareillage.

Pour tout ce qui concerne la *fusion* des acides aminés, c'est le microscope polarisant, à faible grossissement et à platine chauffante, qui est employé selon la technique décrite[2,3].

La précision des déterminations est de $\pm 1°$ au microscope et de 0,5° au bloc chauffant. Toutefois, la fusion des acides aminés s'accompagnant de décomposition, d'autant plus grande que la durée du chauffage a été plus longue, cette précision normale prévue pour des substances stables, ne peut être atteinte avec ceux-ci. Les acides aminés fondent de manière imprécise et il faut, pour obtenir une caractérisation nette, recourir au principe des *fusions eutectiques*. Ces dernières se produisent à température plus basse que celles de la fusion des individus purs du mélange et impliquent par conséquent un chauffage modéré des acides en question. Il en résulte un moindre risque d'altération des acides par chauffage et plus de netteté de ces fusions eutectiques. Chaque détermination prend environ 30 secondes.

Pour ce qui concerne les *indices de réfraction* de ces acides aminés, la littérature ne mentionne que ceux des acides glutamique l, leucine l, β alanine, tyrosine l et glycocolle, déterminés à la température ordinaire par la méthode cristallographique. Nous comptons employer la méthode de *Behrens* utilisant l'immersion et conduisant à des valeurs approchées à $\pm$ 0,001 unité près, en travaillant en lumière monochromatique et à température connue. Ces mesures prennent également 30 secondes chacune.

Nous verrons qu'il pourrait être intéressant de faire ces déterminations en élevant la température jusqu'à 50°, de façon à accentuer certaines différences d'indice, n'apparaissant pas à la température ordinaire, et fixer des gradients d'indice entre 20° et 50° C.

Tableau I. Eutectiques binaires des

*	Acides aminés expérimentés	Formule chimique	Temp. fusion	Système cristallograph. (G)	1	2
1	*Glycine*.....	NH_2-CH_2-COOH	240°/247°	Monoclinique	—	166–168
2	*β Alanine*	$NH_2-(CH_2)_2-COOH$	202°/205°	Rhombique	166–168	—
3	*Ac. ε aminocaproique*	$NH_2-(CH_2)_5-COOH$	205°/210°	Monoclinique	193–195	169
4	*Valine* dl	CH_3 / CH_3 > $CH-CH=$	232°/241°	Monoclinique	négat.	négat.
5	*Norvaline* dl.....	$CH_3-(CH_2)_2-CH=$	déc. vers 275°	Orthorhombique	négat.	négat.
6	*Leucine* dl.....	CH_3 / CH_3 > $CH-CH_2-CH=$	242°/252°	Orthorhombique	négat.	négat. (s)
7	*Isoleucine* dl	C_2H_5 / CH_3 > $CH-CH=$	235°	Rhombique Monoclinique	négat.	négat. (s)
8	*Norleucine* dl	$CH_3-(CH_2)_3-CH=$	déc. vers 250°	Monoclinique	négat.	négat.
9	Ac. *aspartique* dl ..	$COOH-CH_2-CH=$	> 310°	Monoclinique	202–203 (s)	155,5–156,5 (s)
10	Ac. *glutamique* l (+)	$COOH-(CH_2)_2-CH=$	194°/198°	Tétragonal	185—187	163–164 (s)
11	*β Phénylalanine* dl.	$C_6H_5-CH_2-CH=$	271°/273°	Monoclinique	négat.	négat.
12	*Tyrosine* l (−)	$OH-C_6H_4-CH_2-CH=$	245°/253°	Monoclinique	négat.	négat.
13	l (α) *Alanine*.....	$CH_3—CH=$	245° déc.			

(G) Déterminés par M. Gilta, Maître de Conférence, U. L. B. * Les numéros d'ordre des acides aminés sont

L'appareillage pour ce travail implique en plus d'un réfractomètre thermostatisé au 0,01°, l'équipement microscopique employé pour la fusion et qui devient un équipement nécessaire dans un laboratoire de recherche ou de contrôle de matières organiques.

Les *densités* ont été trouvées mentionnées dans la littérature pour 20 individus et grâce à ces valeurs, les *réfractions spécifiques* et les *réfractions moléculaires* expérimentales ont pu être comparées aux valeurs calculées.

La concordance pour les valeurs correspondant au n_g est pour six acides, très bonne.

Ceci donne à la méthode un appui supplémentaire.

I. Température de fusion — Fusion eutectique.

L'un de nous a prospecté les températures de fusion des acides aminés, leur température de sublimation et certaines températures de fusion eutectique. Nous renverrons à ce travail[4] pour les observations faites.

Les eutectiques ne peuvent pas être étudiés par la méthode de contact comme il est généralement préconisé, parce qu'il est impossible de fondre les acides aminés sans les démolir. L'homogénéisation des mélanges

acides aminés entre-eux.

3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
193–195	négat.	négat.		négat.	négat.	202–203 (s)	185–187		
169 (s)	négat.	négat.		négat.	négat.	155,5–156 (s)	163–164 (s)		
–	198	197–198	201–203 douteux	193–195	188	145–148 (s)	154–156 (s)	186	190–191
198	–			négat.	négat.	négat.	négat.		
197–198		–			négat.	235–237	négat.		
douteux (201–203)	négat.		–		négat.	négat. (s)	négat. (s)		
193–195	négat.			–	négat.	négat. (s)	négat. (s)		
188	négat.	négat.	négat.	négat.	–	243–244	négat. (s)	222–230	négat.
145–148 (s)	négat.	235–237		négat.	243–244	–	négat.		
154–156 (s)	négat.	négat.	négat.	négat.	négat.	négat.	–		
186			négat.	négat.	222–230		négat.		
190–191					négat.	négat.			
	négat.	négat.				212–214	183		

reproduits dans leur classement vertical et horizontal. (s) Voir la prochaine publication, page 332.

eutectiques se fait en broyant les individus très finement, pour assurer un très bon contact. Comme ces acides sont solubles dans l'eau, il est possible d'assurer un très bon contact en mélangeant les solutions aqueuses ou alcooliques des partenaires, évaporant sous vide ou sur bloc chauffant à basse température et déterminant sur le résidu broyé, la température eutectique de fusion.

Choix des acides aminés étudiés.

Douze acides aminés de structures chimiques différentes ont été choisis pour l'étude de leur comportement à la fusion. Ce sont : le glycocolle, la β alanine et l'acide ε aminocaproique qui ont les fonctions NH_2 et COOH séparées par une chaîne aliphatique de un à cinq CH_2; la (l) α alanine a été comparée à la β alanine.

Les autres sont des α amino acides en chaînes normales, ou ramifiées, portant en outre une seconde fonction (COOH pour les acides aspartique et glutamique, C_6H_5 pour la β phényl alanine et C_6H_4OH pour la tyrosine).

D'autres acides plus intéressants du point de vue industriel peuvent être étudiés aussi. Cela fera l'objet d'extensions ultérieures du travail.

Les températures de fusion de ces acides sont supérieures à 190° et pour la plupart supérieures à 250°. Les acides étudiés ici appartiennent à des systèmes cristallins différents.

Commentaires au sujet des températures de fusion des eutectiques binaires.

Eutectiques binaires des acides aminés entre-eux (Tableau I).

Les trois acides aminés en chaîne normale et portant à chaque bout une fonction caractéristique NH_2 et COOH (glycocolle, β alanine et acide ε amino caproique) font eutectique entre-eux. Avec les autres acides aminés, le résultat dépend essentiellement de la longueur de la chaîne.

C'est ainsi que le *glycocolle* fait eutectique avec l'acide aspartique et non avec le glutamique. Ces deux acides α aminés diffèrent l'un de l'autre par un CH_2. Cet eutectique fond à 202°—203°.

La *β alanine* qui diffère du glycocolle par un CH_2 en plus, fait eutectique à la fois avec les acides aspartique et glutamique.

Si nous passons à l'acide *ε amino caproique* dont les deux fonctions terminales sont encore plus éloignées, celui-ci fait eutectique net avec chacun des acides aminés étudiés. Les acides en chaîne normale et aux fonctions terminales, forment entre-eux des eutectiques dont la température de fusion croît avec l'allongement des chaînes.

Les acides en chaîne normale (*1*, *2*, *3*) forment aussi des eutectiques avec les *α amino acides*. Si l'on compare le comportement de la norleucine (*8*) et de la norvaline (*5*) au point de vue de leurs eutectiques avec l'acide ε amino caproique (*3*), on constate que le second qui contient un CH_2 de moins, fond 10° plus haut que le premier. L'allongement de chaîne dans la série des α amino acides aurait un effet différent de celui apporté par l'allongement de chaîne dans la série des acides en chaîne normale et fonctions terminales.

Lorsqu'une seconde fonction COOH terminale existe dans la molécule (biacide monoaminé) comme dans les acides aspartique (*9*) et glutamique (*10*), l'eutectique fond moins haut qu'avec des α amino acides proprement dits. L'acide glutamique donne avec l'acide ε amino caproique un eutectique qui fond plus haut qu'avec l'acide aspartique.

Un substituant phényle [β phénylalanine (*11*)] ou un substituant hydroxyphénylé [l – tyrosine (*12*)] dans l'acide α aminé a pour effet de produire avec l'ε amino caproique un eutectique à fusion plus élevée.

On a pu comparer également les eutectiques de la β alanine et de la l (α) alanine. Cette dernière donne des eutectiques avec les acides aspartique et glutamique qui fondent plus haut, révélant toujours un effet de structure sur la température de fusion des eutectiques.

Un certain nombre de résultats positifs sont mentionnés qui permettent des identifications faciles par ce moyen.

Eutectiques binaires avec des biacides organiques oxygénés (Tableau II).

Les températures de fusion eutectique sont plus basses pour des mélanges d'acides aminés et d'acides oxygénés que pour des mélanges d'acides aminés.

Tableau II. Eutectiques binaires avec les biacides organiques.

	Ac. oxalique COOH—COOH $T_f = 189°$ Monoclinique	Ac. malonique COOH—CH_2—COOH $T_f = 131-136°$ Triclinique	Ac. succinique COOH$(CH_2)_2$—COOH $T_f = 188°$	Ac. adipique COOH $(CH_2)_4$—COOH $T_f = 154°$ Monoclinique	Ac. tartrique COOH—$(CHOH)_2$—COOH $T_f = 169°$ Triclinique	Ac. ascorbique $C_8H_8O_6$ $T_f = 186°$	Ac. phtalique $T_f = 206°$ Rhombique
1	132/133	liq. $t°$ ord.	144	146	liq. $t°$ ord.	130—131	110—111
2							
3	102	humide T. ord.	97	69	78—78,5	92	73—74
4							
5							
6							
7							
8	127	< 90	160—161	146—147	118	157	111—115
9		99—102 (s)	177 (s)		141—142 (s)		
10	64/65	101	170—171 (s)	négat.	135 (s)	165—166	132—134
11	129	105	158—159		130	159—160	
12	71	119—121	182—183		156	180—181	

Pour mémoire: 1 = Glycine; 2 = β alanine; 3 = Ac. ε amino caproique; 4 = Valine dl; 5 = Norvaline dl; 6 = Leucine dl; 7 = Isoleucine dl; 8 = Norleucine dl; 9 = Ac. aspartique dl; 10 = Ac. glutamique l (+); 11 = β phénylalanine dl; 12 = Tyrosine l (—).

Il est parfois nécessaire de sublimer les acides pour obtenir un résultat positif et se débarrasser des molécules d'eau de cristallisation. Les acides succinique et tartrique semblent de bons partenaires, donnant des eutectiques différents avec chacun des acides aminés étudiés.

Les chaînes aminées à fonctions terminales et en particulier l'acide ε amino caproique forment des eutectiques fusibles en dessous de 100°, beaucoup plus bas que ceux obtenus avec les α amino acides.

Des acides aussi différents du point de vue de la fusion que les acides glutamique (194°) et aspartique (> 310°) donnent avec l'acide tartrique des eutectiques fusibles respectivement à 135° et 141°, ce qui démontre aussi l'effet prédominant de la structure des partenaires pour permettre ou entraver la formation de l'eutectique et fixer sa température de fusion.

Tableau III. Eutectiques binaires caractéristiques.

	Glucose $C_6H_{12}O_6$ $T_f = 146°$ Rhomboédrique	Lactose $C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$ Fus. anh. = 201° Rhomboédrique	Mannitol $CH_2OH(CHOH)_4CH_2OH$ $T_f = 167°$ Rhomboédrique
1	140—141	négat.	156
2			
3	déc. 115	133—134	147—147,5 (s)
4			
5			
6	138—139	162—164	négat. (s)
7	136—138	164—164,5	163,5—164 (s)
8	135	165—166	négat.
9			
10	140—144	190—191 déc.	157—158
11			
12			

Pour mémoire: 1 = Glycine; 2 = β alanine; 3 = Ac. ε amino caproique; 4 = Valine dl; 5 = Norvaline dl; 6 = Leucine dl; 7 = Isoleucine dl; 8 = Norleucine dl; 9 = Ac. aspartique dl; 10 = Ac. glutamique l (+); 11 = β phénylalanine dl; 12 = Tyrosine l (—).

Tableau IV. Eutectiques binaires caractéristiques.

	Ac. o-hydroxy-benzoïque $T_f = 157°$ Monoclinique	Ac. p-hydroxy-benzoïque $T_f = 214°$ Monoclinique	Nipagine M. $T_f = 127,5°$	Aspirine $T_f = 135°$	Hydro-quinone $C_6H_4(OH)_2$ $T_f = 172°$	Pyrogallol. $C_6H_3(OH)_3$ $T_f = 133°$
1	négat.	négat.	120—121	126—127	négat.	106
2						négat.
3	humide T. ord.	131 (s)	112—113 (s)	69—71	140	71—74
4						
5						
6	135—145	205 (s)	négat. (s)			
7	131—140	négat. (s)	négat. (s)			
8	141—145	189	négat.	120—115	168	99—100
9		négat. (s)		négat.	négat. (s)	négat.
10	négat.	182—184 (s)	125—126	122	166 (s)	126—127
11	139—140	197				
12	—	207°—208°				

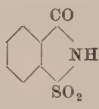
Pour mémoire: 1 = Glycine; 2 = β alanine; 3 = Ac. ε aminocaproique; 4 = Valine dl; 5 = Norvaline dl; 6 = Leucine dl; 7 = Isoleucine dl; 8 = Norleucine dl; 9 = Ac. Aspartique dl; 10 = Ac. Glutamique l (+); 11 = β phénylalanine dl; 12 = Tyrosine l (—).

Les tableaux III et IV résument les essais faits pour obtenir des eutectiques d'acides aminés avec des substances organiques portant des fonctions diverses comme les sucres, les phénols. Les résultats utilisables pour l'identification des acides aminés sont consignés.

Eutectiques binaires des acides aminés avec des dérivés azotés (Tableaux V et VI).

Les substances à fonctions azotées forment avec les acides aminés des eutectiques caractéristiques. La dicyandiamide, la thiourée, la saccharine et l'acide hippurique sont à signaler particulièrement.

Tableau V. Eutectiques binaires caractéristiques.

	Ac. Hippurique $C_6H_5-CONH-CH_2-COOH$ (Benzoyl glycine) $T_f = 190°$ Rhomboédrique	α Chlor-acétamide $Cl-CH_2-CO-NH_2$ $T_f = 119{,}5°$ Monoclinique	Saccharine  $T_f = 228°$
1	175—176	116	179—171
2			
3	128 (s)	96—100 (s)	humide à T. ord. (s)
4			
5			
6	173—174 (s)	109—110 (s)	187—188 (s)
7	168—169 (s)	~100 (s)	172—175 (s)
8	170	négat.	186
9	négat. (s)		219—218 (s)
10	174—175 (s)	118	185—186 (s)
11	160°		172—176
12			215—216

Pour mémoire: 1 = Glycine; 2 = β alanine; 3 = Ac. ε amino caproique; 4 = Valine dl; 5 = Norvaline dl; 6 = Leucine dl; 7 = Isoleucine dl; 8 = Norleucine dl; 9 = Ac. aspartique dl; 10 = Ac. glutamique l (+); 11 = β phénylalanine dl; 12 = Tyrosine l (—).

Les acides aminés portant les fonctions NH_2 et COOH aux deux extrémités (acide ε amino caproique) forment des eutectiques fondant plus bas que ceux obtenus avec les α amino acides. Une chaîne ramifiée sur la fonction amino acide en α fournit un eutectique fusible à température plus basse qu'avec l'isomère non ramifié.

Cette étude devrait être complétée par l'examen de médicaments azotés que l'on se procure facilement dans le commerce et qui, de ce fait, serviraient de réactifs d'identification des acides aminés.

Tableau VI. Eutectiques binaires caractéristiques.

	Urée $CO(NH_2)_2$ $T_f = 135°$ Tétraédrique	Dicyandiamide $NH=C(NH_2)NHCN$ $T_f = 210°$	Thiourée $SC(NH_2)_2$ $T_f = 178{,}5° - 179°$ Rhomboédrique
1	126	180—181	163—164
2			
3	115—116 (s)	154—155 (s)	134—135 (s)
4			
5			
6	123 (s)	192/194 (s)	négat. (s)
7	126 (s)	189—190 (s)	168 (s)
8		183—189	négat.
9	126 (s)	170—172 (s)	négat. (s)
10	126 (s)	167 (s)	169—170 (s)
11	124—125	183	166—163
12		200—201	

	T. f. eutectique
Ac. ε amino caproique + Véronal 190°	176 (s)
+ Atophan 213°	117 (s)
+ Salipyrine 91°	72— 73
+ Pantocaïne 148°	114—115
+ $C_6H_5—C(=S\ 128°)NHNHCH_4Br$	119—118

Ac. glutamique l (+) + Atophan 213°: 190—189 (s).

En résumé.

Les observations consignées dans les tableaux précédents au sujet des fusions *eutectiques* des mélanges binaires avec les *acides aminés* peuvent être classées de façon à mettre en évidence les essais les plus typiques et recommandables pour leur identification.

Les acides sont rappelés dans l'ordre où ils apparaissent dans les tableaux.

Eutectiques binaires recommandables pour l'identification de 12 acides aminés.

Acides aminés	T_f	Partenaire eutectique	T_f	Température de fusion eutectique
Glycine	240°—247°	β alanine	202°—205°	166°—168°
		ac. ε amino caproique	205°—210°	193°—195°
β Alanine	202°—205°	glycine	240°—247°	166°—168°
		ac. ε amino caproique	205°—210°	169° (s)
		ac. aspartique dl	> 310°	155,5°—156,5° (s)
		ac. glutamique l (+)	194°—198°	163°—164° (s)
		$C_6H_5 \cdot CS \cdot NH \cdot NH \cdot C_6H_4Br$	128°	107°—109°
Ac. ε amino caproique	205°—210°	β alanine	202°—205°	169° (s)
		norleucine dl	250° déc.	188°
		isoleucine dl	235°	192°—195°
		ac. aspartique dl	> 310°	145°—148° (s)
		ac. glutamique l (+)	194°—198°	154°—156° (s)
		ac. oxalique	189°	102°
		ac. succinique	188°	97°
		ac. adipique	154°	69°
		ac. tartrique	169°	78°—78,5°
		ac. ascorbique	186°	92°
		ac. phtalique	206°	73°—74°
		lactose	201°	133°—134°
		mannitol	167°	147°—147,5° (s)
		ac. para hydroxybenzoïque	214°	131° (s)
		nipagine M	127,5°	112°—113° (s)
		aspirine	135°	69°—71°
		hydroquinone	172°	140°
		pyrogallol	133°	71°—74°
		ac. hippurique	190°	128° (s)
		ac. diiodohippurique	218°	129°—130° (s)
		α chlor-acétamide	119,5°	96°—100° (s)

Continuation.

Acides aminés	T_f	Partenaire eutectique	T_f	Température de fusion eutectique
		urée (subl.)	135°	115°—116° (s)
		dicyandiamide	210°—212°	154°—155° (s)
		thiourée	179°	134°—135°
		atophan	213°	117°
		salipyrine	91°	72°—73°
		pantocaine	148°	114°—115° (s)
		$C_6H_5CS \cdot NH \cdot NH \cdot C_6H_4Br$	128°	118°—119°
Valine dl	232 241	ac. ε amino caproïque	205°—210°	198°
Leucine dl	242°—252°	glucose	146°	138°—139°
		lactose	201°	162°—164°
		ac. ortho hydroxybenzoïque	157°	135°—145° (s)
		ac. hippurique	190°	173°—174° (s)
		α chlor acétamide	119,5°	109°—110° (s)
		saccharine	228°	187°—188° (s)
		urée (sublimée)	135°	123° (s)
		dicyandiamide	210°	192° (s)
Isoleucine dl	235	ac. ε amino caproique	205°—210°	193°—195°
		glucose	146°	136°—138°
		lactose	201°	164°—164,5°
		mannitol	167°	163,5°—164° (s)
		acide ortho hydroxybenzoique	157°	131°—140°
		ac. hippurique	190°	168°—169° (s)
		α chlor acétamide	119,5°	env. 100° (s)
		saccharine	228°	172°—175° (s)
		urée (subl.)	135°	126° (s)
		dicyandiamide	210°	189°—190° (s)
		thiourée	178,5°—175°	168° (s)
Norleucine dl	250° déc.	ac. ε amino caproique	205°—210°	188°
		ac. oxalique	189°	127°
		ac. malonique	131°—136°	< 90°

Acides aminés	T_f	Partenaire eutectique	T_f	Température de fusion eutectique
		ac. adipique	154°	146°—147°
		ac. tartrique d	169°	118°
		ac. ascorbique	186°	157°
		ac. phtalique	206°	111°—115°
		glucose	146°	135°
		lactose	201° [6]	165°—166°
		ac. ortho hydroxybenzoïque	157°	141°—145°
		ac. para hydroxybenzoïque	214°	189°
		aspirine	135°	115°—120°
		hydroquinone	172°	168°
		pyrogallol	133°	99°—100°
		ac. hippurique	190°	170°
		saccharine	228°	186°
Ac. aspartique dl	> 310°	β alanine	202°—205°	155,5°—156,5° (s)
		ac. ε amino caproïque	205°—210°	145°—148° (s)
		ac. malonique	131°—136°	99°—102° (s)
		ac. tartrique	169°	141°—142° (s)
		urée (subl.)	135°	126° (s)
		dicyandiamide	210°	170°—172° (s)
Ac. glutamique l (+)	194°—198°	β alanine	202°—205°	163°—164° (s)
		ac. ε amino caproïque	205°—210°	154°—156° (s)
		ac. malonique	131°—136°	101°
		ac. tartrique	169°	135° (s)
		ac. ascorbique	186°	165°—166°
		ac. para hydroxylenzoïque	214°	182°—184° (s)
		hydroquinone	172°	166° (s)
		ac. hippurique	190°	174°—175° (s)
		saccharine	228°	185°—186° (s)
		urée (subl.)	135°	126° (s)
		dicyandiamide	210°	167° (s)

Continuation.

Acides aminés	T_f	Partenaire eutectique	T_f	Température de fusion eutectique
		thiourée	178,5°—179°	169°—170° (s)
		$C_6H_5CS \cdot NH \cdot NH \cdot C_6H_4Br$	128°	119°
β Phénylalanine dl...	271°—273°	ac. ε amino caproique	205°—210°	186° (s)
		ac. oxalique	189°	129° (s)
		ac. malonique	131°—136°	105° (s)
		ac. tartrique	169°	130° (s)
		ac. ascorbique	186°	159°—160°
		ac. ortho hydroxybenzoïque	157°	139°—140°
		ac. para hydroxybenzoïque	214°	197°
		ac. hippurique	190°	160°
		saccharine	228°	172°—176°
		urée (subl.)	135°	124°—125°
		dicyandiamide	210°	183°
		thiourée	178,5°—179°	166°—163°
Tyrosine l (—)	245°—253°	ac. ε amino caproique	205°—210°	190°—191° (s)
		ac. oxalique	189°	71° (s)
		ac. malonique	131°—136°	119°—121° (s)
		ac. tartrique	159°	156° (s)
		ac. ascorbique	186°	180°—181° (s)
		ac. para hydroxybenzoïque	214°	207°—208° (s)
		saccharine	228°	215°—216° (s)
		dicyandiamide	210°	200°—201° (s)

II. Indices de réfraction.

L'indice de réfraction des acides aminés cristallisés est mal connu même à la température ordinaire. La *méthode par immersion*, en utilisant les lignes de *Becke*, permet cependant facilement de recueillir des informations.

La difficulté réside dans le fait que ces acides se présentent souvent sous forme de petits cristaux, qui ne permettent pas d'en faire des coupes orientées et de déterminer les différents indices selon les directions privilégiées de vibration, conformément à la technique cristallographique.

Tous ces cristaux pour un même individu, même d'origines différentes, se présentent de la même manière sur le porte objet et sont développés dans la même direction. Nous verrons en effet plus loin, que les indices déterminés dans les conditions adoptées donnent des valeurs reproductibles aux erreurs d'expérience près, pour des individus de provenances différentes, en se servant de la technique préconisée dans ce travail.

Ceci signifie qu'ils présentent à l'observation la même section dans l'ellipsoide de *Fresnel* et que les vitesses de propagation de la lumière dans cette section, selon les composantes des directions privilégiées de propagation de la lumière, seront mesurables. Ces valeurs seront conventionnelles, mais si elles sont reproductibles pour un individu, elles pourront servir à son identification aussi bien que les indices réels.

Indice de réfraction à la température ordinaire.

Le *mode opératoire* consiste à placer entre nicols croisés, en lumière parallèle et monochromatique (filtre ou raie *D*) entre porte-objet et couvre-objet un cristal baignant dans un liquide dont l'indice est connu. L'observation du déplacement des lignes de *Becke*, lorsque l'on soulève le tube du microscope, permettra de fixer la relation entre l'indice du cristal et celui du liquide d'immersion.

Toutefois, avant d'observer ces déplacements des lignes de *Becke*, le cristal est orienté entre nicols de façon à obtenir l'extinction; la position est fixée, l'analyseur est éloigné et les lignes de *Becke* observées.

Une échelle d'indices liquides est utilisée permettant de placer l'indice du cristal, *dans cette direction*, entre deux valeurs d'indice connues à la température ordinaire. Cette *échelle d'indice* est donnée plus loin.

Lorsque l'intervalle d'indice est fixé dans la première direction, le cristal est tourné de 90°. Dans cette position, la lumière se propage avec une vitesse plus grande et les déterminations en première approximation se font de la même manière que plus haut.

Nous appelerons «n_p» et «n_g» les deux indices conventionnels déterminés ainsi, ils peuvent être donnés à $\pm$ 0,001 près si l'on observe la température et travaille en lumière monochromatique[5].

Ces déterminations sont faites sur la plaque du microscope munie d'un thermomètre, la lumière transmise parallèle passant au travers d'un filtre rouge pour colorimétrie.

Les liquides d'indices connus utilisés en premier lieu sont des substances pures (tableau VII). Ensuite, des mélanges de monobrome naphtalène et de paraffine sont constitués, qui permettent de resserrer les limites d'indices entre lesquelles se placent les n_p et n_g cherchés. Cette seconde échelle de liquides de référence est constituée par mélanges de gouttes sur porte-objet ou en tube. Après homogénéisation, une goutte du mélange sert à la détermination de l'indice du cristal et une autre pour fixer celui du liquide à température connue au réfractomètre d'*Abbe*.

Cette première orientation obtenue, on prépare à l'aide de paraffine ($n_d^{20} = 1{,}4810$, $d_{20}^{20} = 0{,}851$) et de monobromonaphtalène ($n_d^{20} = 1{,}6580$. $d_4^{20} = 1{,}4875$) des mélanges *en proportions pesées*[6].

L'indice approximatif du mélange à préparer est fixé et les quantités des deux réactifs nécessaires pour atteindre cet indice sont calculées d'après la formule:

$$\frac{a\,n_1 + b\,n_2}{a+b} = n_3$$

dans laquelle a est le volume du liquide d'indice n_1: b celui du liquide d'indice n_2 et n_3 l'indice désiré.

Tableau VII. Liquides de référence pour mesure d'indice de réfraction entre 15° et 25°.

	Liquide	$n_D^{15°}$	$n_D^{20°}$	$n_D^{25°}$
1	*Éthanol*	1,3665	1,3644	1,3622
2	*Chloroforme*	1,4481	1,4452	1,4422
3	*Tétrachlorure de carbone*	1,4634	1,4603	1,4574
4	*Huile de paraffine*	1,4828	1,4810	1,4791
5	*Toluène*	1,4982	1,4954	1,4928
6	*m-Xylène*	1,5000	1,4974	1,4950
7	*Huile de cèdre*	1,5055	1,5037	1,5013
8	*Monochlorobenzène*	1,5273	1,5248	1,5220
9	*Nitrobenzène*	1,5550	1,5528	1,5502
10	*Bromobenzène*	1,5628	1,5601	1,5575
11	*o-Toluidine*	1,5739	1,5718	1,5692
12	*Aniline*	1,5860	1,5842	1,5814
13	*Iodobenzène*	1,6228	1,6201	1,6172
14	*Monobromonaphtalène*	1,6601	1,6580	1,6555

Tableau VIII. Indices de réfraction des mélanges* monobromonaphtalène et huile de paraffine mesurés à l'Abbe entre 20° et 50°.

N° liq.	20° C	25° C	35° C	40° C	45° C	50° C	Poids de Paraffine g
1	1,5572	1,5553	1,5513	1,5492	1,5470	1,5451	1,132
2	1,5590	1,5570	1,5528	1,5508	1,5485	1,5465	1,106
3	1,5600	1,5580	1,5540	1,5520	1,5497	1,5477	1,080
4	1,5611	1,5591	1,5550	1,5530	1,5508	1,5488	1,055
6	1,5580	1,5560	1,5520	1,5499	1,5479	1,5458	1,112
8	1,5585	1,5564	1,5524	1,5503	1,5482	1,5451	1,099
9	1,5220	1,5202	1,5162	1,5143	1,5125	1,5105	2,835
10	1,5230	1,5211	1,5171	1,5151	1,5132	1,5112	2,746
11	1,5242	1,5223	1,5184	1,5165	1,5145	1,5126	2,664
12	1,5250	1,5230	1,5190	1,5172	1,5152	1,5132	2,584
13	1,5330	1,5312	1,5272	1,5252	1,5233	1,5212	2,055
14	1,5342	1,5322	1,5282	1,5262	1,5242	1,5222	2,000
15	1,5352	1,5332	1,5291	1,5272	1,5252	1,5232	1,947
16	1,5385	1,5364	1,5323	1,5304	1,5283	1,5265	1,800
17	1,5395	1,5374	1,5333	1,5313	1,5292	1,5272	1,755
18	1,5264	1,5244	1,5204	1,5184	1,5165	1,5146	2,507

* Tous ces mélanges sont préparés à partir de 1 ml = 1,4875 g de monobromonaphtalène.

Tableau IX. Indices de réfraction d'acides aminés à température voisine de 20°.

Acides aminés	Formule	n_D ± 0,002	Liq. réf. n°	n_g ± 0,002	Liq. réf.	$(n_g - n_D)$
Ac. ε amino caproique	$NH_2(CH_2)_5COOH$	1,504	7	1,536	8, 9	0,032
Valine dl	$\begin{matrix}CH_3\\ \\CH_3\end{matrix}\!\!>\!CH \cdot CH=$	1,580	11, 13	1,602	12, 13	0,022
Norvaline dl	$CH_3(CH_2)_2CH=$	1,481	4, 5, 6	1,502	7	0,021
Leucine dl	$\begin{matrix}CH_3\\ \\CH_3\end{matrix}\!\!>\!CH \cdot CH_2CH=$	1,538	8, 9	1,557	9, 10	0,019
Isoleucine dl	$\begin{matrix}C_2H_5\\ \\CH_3\end{matrix}\!\!>\!CH \cdot CH=$	1,552	9	1,581	12	0,029
Norleucine dl.....	$CH_3(CH_2)_3CH=$	1,522	8	1,558	9, 10	0,034

Tableau X. Reproductibilité des mesures sur des échantillons de provenances différentes.

		n_p	n_g
Norleucine dl	Kodak	1,523	1,558
	Pfanstiehl	1,522	1,558
	Nutritional	1,524	1,558
Norvaline dl	B. D. H.	1,481	1,502
	Roche	1,480	1,501
	Nutritional	1,480	1,502
Iso *Leucine*	Kodak	1,552	1,581
	Roche	1,551	1,581
	Nutritional	1,550	1,580

Les six acides aminés expérimentés se distinguent les uns des autres par leurs n_p et n_g déterminés dans les conditions décrites. à la température ordinaire.

Font exception, pour leurs n_g qui sont quasi identiques, la leucine dl et la norleucine dl. Ces deux acides sont toutefois identifiables par leur n_p et les différences $(n_g - n_p)$ suffisamment caractéristiques (Tableau IX).

Trop peu de cas ont été étudiés pour conduire à des observations d'*effet de structure* sur l'indice de réfraction pris à la température ordinaire.

On remarque cependant que les acides aminés comme le glycocolle et l'acide ε amino caproique ont des indices n_p bas et des différences $(n_g - n_p)$ importantes comparées aux valeurs se rapportant aux α amino acides.

Les longues chaînes semblent devoir donner des indices plus bas n_p et de plus grandes différences $(n_g - n_p)$. Il en est ainsi pour l'indice de l'acide ε amino caproique, la norleucine et la norvaline, comparées à celui de la valine dl.

La ramification de la chaîne se révèle par l'indice de réfraction sans toutefois accentuer les différences $(n_g - n_p)$ qui sont moins caractéristiques pour ces individus que les indices eux-mêmes.

Variation de l'indice de réfraction entre 20° et 50°.

Là où il a été observé que les n_g sont identiques à 20°, on a essayé de les différencier en les déterminant à température plus élevée et jusque 50°.

La méthode de détermination d'indice de réfraction par immersion s'exécute à la température ordinaire ou à la fusion (pour les solides) en se servant d'une référence d'indice considéré comme invariable

(liquide de référence à température ordinaire ou verre dont l'indice est connu et est considéré stable dans la zone de fusion des corps organiques).

Tableau XI. Intervalles de températures correspondant aux égalités d'indices de réfraction pour la:

Norleucine dl		Leucine dl	
n_p	n_g	n_p	n_g
Liq. n° 10—23°/28°	*Liq. n° 1*—20°/22°	*Liq. n° 16*—28°/30°	*Liq. n° 1*—23°/26°
23°/30°	20°/22°	29°/32°	23°/26°
23°/27°	Moyenne 20°/22°	30°/38°	Moyenne 23°/26°
24°/28°		32°/40°	
24°/29°		28°/40°	
23°/29°	*Liq. n° 2*—40°/45°	Moyenne 30°/36°	*Liq. n° 2*—25°/32°
23°/27°	40°/45°		25°/31°
22°/27°	Moyenne 40°/45°	*Liq. n° 17*—42°/49°	25°/32°
22°/30°		39°/44°	Moyenne 25°/32°
23°/25°	*Liq. n° 6*—28°/35°	42°/50°	
23°/25°	28°/33°	25°/29°	*Liq. n° 3*—31°/37°
23°/26°	28°/34°	25°/31°	31°/40°
Moyenne 23°/27°	28°/36°	29°/43°	Moyenne 31°/39°
	26°/35°	Moyenne 34°/41°	
Liq. n° 11—26°/36°	Moyenne 28°/35°		*Liq. n° 4*—36°/41°
26°/37°			36°/41°
26°/35°	*Liq. n° 8*—35°/41°		37°/42°
26°/37°	32°/39°		Moyenne 36°/41°
26°/35°	35°/40°		
25°/35°	Moyenne 34°/40°		
25°/32°			
26°/33°			
Moyenne 26°/35°			
Liq. n° 12—30°/38°			
30°/36°			
31°/37°			
30°/37°			
30°/35°			
29°/35°			
Moyenne 30°/36°			
Liq. n° 18—32°/41°			
33°/42°			
31°/43°			
35°/43°			
34°/43°			
34°/43°			
Moyenne 33°/42°			

L'erreur sur la détermination d'indice par cette méthode est absolument négligeable puisque l'on atteint au plus deux unités de la troisième décimale en précision et que la variation d'indice par degré centigrade est de 0,0000022 pour les verres et de l'ordre de 0,00045 pour l'indice de réfraction des liquides organiques jusqu'à 200°.

On peut très bien concevoir une technique dans laquelle l'indice d'un *solide* immergé dans un liquide est déterminé à diverses températures, par comparaison avec l'indice de ce liquide aux mêmes températures.

L'indice du liquide peut être déterminé jusqu'à 90° au réfractomètre d'*Abbe* thermostatisé à $\pm$ 0,01° C avec une approximation de 0.0001. c'est-à-dire, plus qu'il n'en faut pour la méthode employée. Les lignes de *Becke* et leur mouvement indiquent la relation d'indices du liquide et du solide.

Les liquides de référence destinés à l'étude des indices des acides aminés entre 25 et 50° sont des mélanges, préparés par pesée (au trébuchet), de paraffine et de monobromonaphtalène. Leurs variations d'indice avec la température sont consignées dans le tableau VIII.

Des graphiques sont dressés permettant d'interpoler entre deux températures.

Tableau XII. Variations d'indices de réfraction en fonction de la température.

Norleucine dl				Leucine dl			
T° C	$n_p \pm 0{,}001$	T° C	$n_g \pm 0{,}001$	T° C	$n_p \pm 0{,}001$	T° C	$n_g \pm 0{,}001$
23°	1,521	20°	1,557	25°	1,537	23°	1,556
26°	1,522	22°	1,556	28°	1,535	25°	1,557
27°	1,520	28°	1,555	29°	1,536	26°	1,555
30°	1,521	34°	1,553	30°	1,534	31°	1,555
33°	1,521	35°	1,552	31°	1,535	32°	1,554
35°	1,518	40°	1,551	34°	1,534	36°	1,555
36°	1,519	40°	1,550	36°	1,532	39°	1,552
42°	1,518	45°	1,549	38°	1,531	41°	1,552
				40°	1,530		
				41°	1,531		
				42°	1,531		
				43°	1,530		
				44°	1,530		
				49°	1,528		
				50°	1,527		

Les acides aminés à examiner sont immergés et la préparation déposée sur la platine chauffante du microscope comme s'il s'agissait de faire une détermination de température de fusion.

L'observation des lignes de *Becke* se fait en lumière monochromatique parallèle (écran monochromatique colorimétrique ou éclairage au sodium). Le liquide d'immersion pour fixer l'indice à température plus élevée est choisi d'indice plus fort que celui de cristal à la température ordinaire.

C'est ainsi que pour fixer le n_g de la norleucine et de la leucine à température supérieure (1,557 à température ordinaire) on immerge ces cristaux dans des liquides qui ont comme indice à la température ordinaire : 1,557, 1,558, 1,559 et 1,560. La température de la préparation est élevée jusqu'à observer l'identité d'indice. Cette égalité ne se produit pas à *une* température. Pendant tout un intervalle de température, le cristal présente un indice de réfraction égal à celui du liquide. Ces données sont consignées dans le tableau ci-dessus.

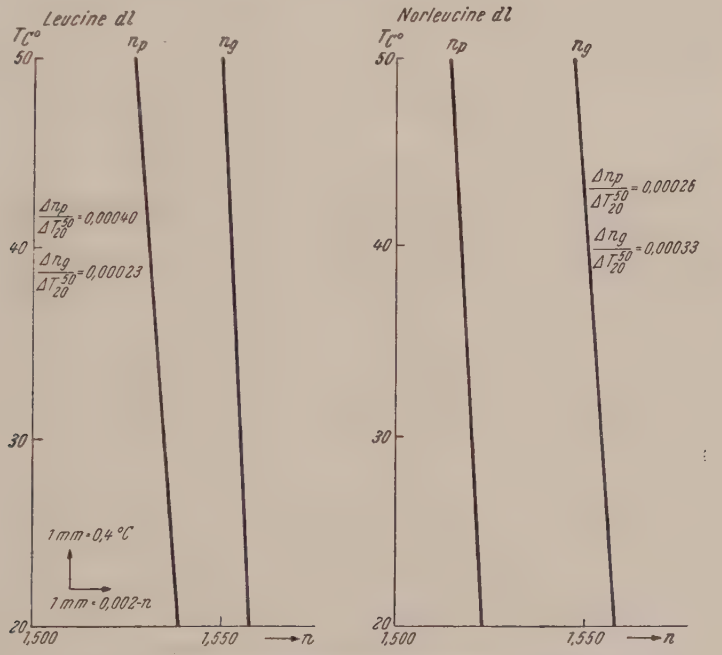


Fig. 1. Variations d'indices de refraction avec la température.

Les indices de réfraction des liquides à ces diverses températures sont déduits à $\pm$ 0,0001 près, des graphiques construits à partir des données du tableau n° VIII. La mesure d'indice des acides aminés ne peut toutefois pas être précisée au delà et 0,001 unité. Il en résulte au sujet de la norleucine dl et de la leucine dl, les indications consignées dans le tableau XII.

Sauf pour le n_p de la leucine qui varie avec la température comme l'indice de réfraction du liquide d'immersion, les indications de ce tableau correspondent à des moyennes calculées sur les chiffres expérimentaux du tableau n° VIII. Ces données ont permis de tracer les graphiques correspondants (Fig. 1), révélant pour les n_g de ces deux acides une différenciation à peine perceptible, même à 50°.

Conclusions relatives aux variations de l'indice de réfraction des acides aminés avec la température.

L'étude de cette variation n'a porté que sur deux acides aminés dont les n_g se confondent à la température ordinaire et sont à peine différents à 50°.

Il en résulte que la température affecte peu les deux indices de ces deux acides entre 20° et 50°.

Toutefois les gradients sont pour

	n_p	n_g
Norleucine dl....	0,00026	0,00033
Leucine dl	0,00040	0,00023

C'est-à-dire que l'identification par ce moyen est facile si l'on combine les données d'indices, les différences $(n_g - n_p)$ à la température ordinaire et les gradients d'indices entre 50° et 20°.

Comme l'installation et le matériel nécessaire pour cette détermination à température supérieure à la température ordinaire est la même que pour les déterminations des t° de fusion et d'eutectique, si l'on dispose d'un réfractomètre thermostatisé, ces mesures ne présentent aucune difficulté. Les mesures à températures supérieures à la température ambiante nécessitent une préparation assez longue en ce sens qu'une collection de liquides de référence doivent être préparés et leur indice déterminé. Mais la détermination de l'indice à une température quelconque est aussi simple et nécessite aussi peu de matière qu'à la température ordinaire. Lorsqu'il s'agit d'un contrôle, c'est un moyen à la fois rapide et économique.

Pour juger de la valeur pratique des déterminations à température ordinaire et à température supérieure, il serait nécessaire d'étendre cette étude à d'autres acides aminés. De même, l'on pourrait ainsi se rendre compte de la portée de ces déterminations en analyse qualitative organique, en étudiant des substances organiques portant d'autres fonctions.

En confrontant tous les renseignements recueillis, y compris ceux de la littérature sur l'indice de réfraction de 13 acides aminés, pris à la température ordinaire et sur leur densité à l'état cristallin, il est démontré que l'indice de réfraction est plus sensible aux isoméries et aux effets de structure que la densité, et convient donc mieux à l'identification.

Les réfractions spécifiques calculées à partir de n_p et n_g sont peu caractéristiques dans la série étudiée. Les réfractions moléculaires expérimentales à partir de ces deux indices ont été calculées selon la formule $\frac{n-1}{d}$.

Les valeurs expérimentales correspondant à n_g sont en bonne concordance avec les valeurs calculées par les incréments atomiques donnés par *Schoorl*[6].

En conséquence, on peut se servir des indices de réfraction, mesurés par immersion à la température ordinaire, pour identifier avec certitude chacun des acides étudiés dans ce travail.

Pour la variation avec la température, les données recueillies quant aux deux acides étudiés à ce point de vue n'apportent pas une amélioration quant à la possibilité d'identification.

Seuls les gradients d'indices par degré sont différents pour les deux acides envisagés. Pour fixer la valeur pratique réelle de cette méthode de mesure d'indice de réfraction à température supérieure à la température ordinaire, il serait nécessaire d'examiner d'autres cas.

Conclusions.

L'identification des acides aminés est possible par leurs constantes physiques déterminées à l'échelle microchimique, c'est-à-dire sur un seul cristal.

Alors que la température de fusion ne permet ni une caractérisation, ni une identification de ces substances, la *température de fusion de mélanges binaires eutectiques* est tout à fait spécifique. Une liste de partenaires eutectiques est donnée pour chacun des acides envisagés, avec la température de fusion eutectique correspondante.

Beaucoup de ces mélanges fondent en dessous de 150° et certains même encore plus bas, de telle façon à ne pas affecter, par une décomposition de l'acide, la netteté de la fusion eutectique.

Ce travail est important, parce qu'il concurrence avantageusement la méthode d'identification des acides aminés par préparation de dérivés caractéristiques. Cette méthode classique consomme assez bien de substance et ne satisfait pas toujours. En effet, certains dérivés obtenus fondent en se décomposant, d'autre part, il manque des renseignements au sujet de dérivés d'un certain nombre d'acides: soit qu'ils ne se forment pas, soit qu'ils n'aient pas été préparés[9].

Chaque préparation de dérivé consomme au moins 50 mg de matière et si la préparation échoue, il faut envisager une perte d'autant de fois 50 mg de matière qu'il est fait de tentatives avec des réactifs différents.

La méthode d'identification est instantanée et plusieurs essais d'identification sont loin de consommer 10 mg, chacun prenant au maximum 1 minute pour son exécution.

Tableau XIII. Résultats pour l'indice

	Acides aminés	Formules	t° C	Syst. cristall.
1	*Glycine*	$NH_2—CH_2 \cdot COOH$	240°/247°	monocl.
2	*β Alanine*	$NH_2 \cdot (CH_2)_2COOH$	202°/205°	orthorh.
3	*Ac. ε amino caproique*	$NH_2—(CH_2)_5COOH$	205°/210°	monocl.
4	*Valine* dl	$(CH_3)_2CH \cdot CH(NH_2)COOH$	232°/241°	monocl.
5	*Norvaline* dl ...	$CH_3—(CH_2)_2—CH(NH_2)COOH$	déc. ~ 275°	orthorh.
6	*Leucine* dl	$(CH_3)_2CH \cdot CH_2 \cdot CH(NH_2)COOH$	242°/252°	orthorh.
7	*Isoleucine* dl ...	$C_2H_5(CH_3)CH \cdot CH(NH_2)COOH$	235°	orthorh.
8	*Norleucine* dl ..	$CH_3(CH_2)_3CH(NH_2)COOH$	déc. ~ 250°	monocl.
9	Ac. *aspartique* dl	$COOH \cdot CH_2 \cdot CH(NH_2)COOH$	310°	tétragon.
10	Ac. *glutamique* l (+)	$COOH \cdot (CH_2)_2 \cdot CH(NH_2)COOH$	194°/198°	monocl.
11	*β Phényl alanine* dl	$C_6H_5 \cdot CH_2 \cdot CH(NH_2)COOH$	271°/273°	monocl.
12	*Tyrosine* l (—) .	$OH \cdot C_6H_4 \cdot CH_2 \cdot CH(NH_2)COOH$	245°/253°	monocl.
13	*α Alanine* dl....	$CH_3 \cdot CH(NH_2)COOH$	déc. ~ 245°	

de réfraction des acides aminés.

n_p	n_g	$n_g - n_p$	d^{20} (8)	$\frac{n_p - 1}{d}$	$\frac{n_g - 1}{d}$	R. M. (n_p)	R. M. (n_g)	R. M. Théorique	Différence R. M. expér. − calc.	P. M.
1,495[7]	1,650[7]	0,155	1,607	0,308	0,404	23,10	30,30	27,3	+ 3,00	75
—	—	—	1,404	—	—	—	—	—	—	89,1
1,504	1,536	0,032	—	—	—	—	—	—	—	—
1,580	1,602	0,022	1,316	0,440	0,437	51,57	51,11	50,57	+ 0,54	117,5
1,481	1,502	0,021	—	—	—	—	—	—	—	—
1,538	1,557	0,019	1,191	0,452	0,467	59,26	61,29	63,54	— 2,25	131,17
1,552	1,581	0,029	—	—	—	—	—	—	—	131,17
1,522	1,558	0,034	1,169	0,446	0,477	58,58	62,62	60,02	+ 2,60	131,17
—	—	—	1,663	—	—	—	—	—	—	133,10
—	—	—	1,538	—	—	—	—	—	—	147,13
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1,550[7]	1,680[7]	0,130	1,456	—	0,462	—	83,56	83,36	+ 0,20	181,18
1,515[7]	1,575[7]	0,060	1,424	0,361	0,403	32,16	35,91	36,69	— 0,78	89,1

Ici nous avons appliqué la technique à des composés fragiles, à fonctions bien caractéristiques. La même méthode peut être fructueuse pour l'identification d'autres corps organiques, soit fragiles, soit peu favorisés du point de vue fonctionnel et se prêtant mal à la préparation de dérivés caractéristiques.

En ce sens, la méthode d'identification préconisée ici est une contribution à la microanalyse fonctionnelle, basée sur l'observation des constantes physiques. Elle peut être étendue à toutes les classes de composés organiques en vue de leur identification à l'échelle microchimique.

On peut aussi voir en cette technique un auxiliaire utile à l'identification des corps organiques apparaissant dans la méthode d'analyse qualitative basée sur la solubilité (méthodes de *Staudinger*, *Shriner* et *Fuson*, *Kamm* etc.).

L'identification des corps organiques par l'observation des constantes telle que nous la décrivons, en accélèrerait les déductions.

Nous poursuivons l'étude de ces techniques et leur extension à d'autres classes de composés organiques. D'autre part, nous envisageons leur développement quantitatif.

Nous exprimons toute notre gratitude au F. N. R. S. de Belgique pour le subside accordé pour ce travail.

Résumé.

Le présent travail, tout en s'inscrivant comme contribution aux microdéterminations des constantes physiques des corps organiques, est en même temps une contribution à la microanalyse fonctionnelle organique, en ce sens qu'il préconise l'emploi de deux constantes physiques: la température de fusion eutectique et l'indice de réfraction pour identifier les acides aminés.

Toutes les déterminations se font en une minute et sur un cristal. Cette méthode est extensible à d'autres classes de composés et susceptible de rendre de grands services dans le contrôle industriel et biochimique.

La méthode préconisée ici pour l'identification des corps organiques concurrence avantageusement celle de préparation des dérivés des substances organiques et permettrait en outre d'accélérer les déductions de l'analyse qualitative organique classique, basées sur les différences de solubilité (méthode de *Staudinger*, *Kamm*, *Shriner*, etc.). Ces nouvelles techniques se prêtent aussi à une extension quantitative.

Zusammenfassung.

Die vorliegende Arbeit ist sowohl ein Beitrag zur Mikrobestimmung physikalischer Konstanten organischer Stoffe, wie gleichzeitig auch ein Beitrag zur funktionellen organischen Mikroanalyse. Es wird vorgeschlagen, die Bestimmung zweier physikalischer Konstanten, nämlich der eutektischen Temperatur und des Brechungsindex zur Identifizierung von Aminosäuren zu verwenden.

Diese Bestimmungen sind in einer Minute an nur einem Kristall ausführbar. Die Methode ist auch auf andere Arten von Verbindungen übertragbar und geeignet, bei der Untersuchung technischer und biochemischer Produkte gute Dienste zu leisten.

Die vorgeschlagene Methode ist vorteilhafter als die Identifizierung organischer Stoffe über den Weg der Herstellung von Derivaten. Außerdem läßt sich mit ihrer Hilfe die Ausführung des klassischen organischen Analysenganges nach dem Prinzip der Löslichkeitsunterschiede (*Staudinger, Kamm, Shriner* u. a.) beschleunigen. Die quantitative Auswertung der angegebenen Verfahren ist in Aussicht genommen.

Summary.

This study, though entitled as a contribution to the microdetermination of the physical constants of organic compounds, is at the same time a contribution to functional organic microanalysis, in the sense that it involves the use of two physical constants: the eutectic fusion temperature and the index of refraction for identifying amino acids.

All the determinations can be made in one minute and on only one crystal. This method may be extended to other classes of compounds and is capable of rendering great service in industrial and biochemical control.

The method given here for the identification of organic compounds competes advantageously with that of preparing derivatives of organic materials and furthermore it permits speeding up the deductions of classical qualitative organic analysis based on the differences in solubility (method of *Staudinger, Kamm, Shriner*, etc.). Quantitative developments are being studied.

Bibliographie.

[1] *Behrens-Kley*, Organische Mikrochemische Analyse. Leipzig: L. Voss. 1922. *N. Schoorl*, Organische Analyse. Amsterdam: N. V. D. B. Centen's. 1937.

[2] *L.* et *A. Kofler*, Mikromethoden zur Kennzeichnung organischer Stoffe und Stoffgemische. Innsbruck: Wagner. 1948.

[3] *A. Lacourt*, J. pharmacie de Belgique — N^{os} 1—2 (1952). Industrie chimique belge, **17**, 217 (1952). Revue de médecine et de pharmacie (Belgique), Section de Pharmacie N° 1 (1952).

[4] *Gh. Sommereyns*, Mikrochim. Acta **1953**, 332.

[5] *E. M. Chamot* et *C. W. Mason*, Handbook of Chemical Microscopy. New York: J. Wiley and Sons. 1946.

[6] *N. Schoorl*, Organische Analyse. Amsterdam: N. V. D. B. Cneten's. 1935.

[7] *Ch. Hodgman*, Handbook of Chemistry. Cleveland. 1947.

[8] *E. J. Cohn, Th. L. McMeekin, J. T. Edsall* et *J. H. Weare*, J. Amer. Chem. Soc. **56**, 2270 (1934); *H. M. Huffman, S. W. Fox* et *E. L. Ellis*, J. Amer. Chem. Soc. **58**, 1728 (1936), **59**, 2144 (1937); *C. L. A. Schmidt*, Chemistry of Amino Acids and Proteins. p. 900. Springfield, Ill.: Thomas. 1938.

[9] *N. D. Cheronis* and *J. B. Entrikin*, Semimicro Qualitative Organic Analysis. p. 416. New York: Th. Crowell Co. 1947.

Département de Microchimie de l'Université libre de Bruxelles.

Microdétermination des constantes physiques des acides aminés.

La température de fusion selon Kofler.

Par

Gh. Sommereyns.

(Reçu le 29 juin 1953.)

Les constantes physiques des acides aminés sont peu connues. La littérature ne fournit à ce sujet que très peu de renseignements. Il semble donc intéressant d'essayer de compléter cette lacune, d'autant plus que ces composés jouent un rôle si important dans la vie, l'agriculture et l'industrie. Leur étude est devenue un problème d'actualité.

Dans les publications les plus récentes[1] la préparation et la purification des acides aminés de synthèse sont données sans autre critère de pureté que les températures de fusion de certains dérivés.

Ces dérivés qui servent à l'identification des acides aminés sont nombreux. Cependant leur préparation demande une certaine quantité de matière et implique des manipulations qui consomment du temps. De plus, les renseignements recueillis dans la littérature au sujet des constantes physiques de ces dérivés présentent des lacunes, ne permettant pas toujours une identification certaine de l'acide aminé envisagé[2].

Il en est ainsi par exemple pour la citrulline l, la thyroxine dl, la thréonine d et l, la norleucine d, la créatine, la créatinine, la norvaline l dont la littérature ne mentionne presque pas, et dans certains cas même, pas de dérivés. Un autre exemple est donné par la β alanine et l'arginine dl, pour lesquels les températures de fusion de l'acide aminé et de ses dérivés sont très proches. De plus, les températures de fusion des dérivés ne sont pas toujours facilement accessibles, elles s'accompagnent souvent de décomposition. Citons à ce sujet les picrolonates formés avec les acides aspartique et glutamique dl, avec la glycine et l'histidine l, les dérivés benzoylés de l'histidine l et dinitrobenzoylés du tryptophane l, de la cystine l.

Les températures de fusion considérées ci-dessus se trouvent dans le tableau suivant et sont tirées de l'ouvrage de *N. D. Cheronis* et *J. B. Entrikin*[2].

Le problème de la détermination des constantes à la fusion a été abordé ici avec l'idée de s'en servir pour l'identification des acides aminés et comme moyen d'investigation de mélanges de ceux-ci.

Il existe dans la littérature une grande confusion au sujet de ces constantes. Les acides aminés fondent très haut, se décomposent facilement au cours d'une élévation de température. Ces faits entraînent inévitablement un manque de netteté et de précision dans les déterminations.

Ainsi l'acide glutamique d fond avec décomposition à différentes températures variant de 198 à 225° C[2]. L'intervalle de décomposition dépend de la vitesse de chauffe à laquelle est soumise la substance. Ainsi, la décomposition de la tyrosine l a lieu à 314—8° C au cours d'un chauffage rapide et de 290—5° C au cours d'un chauffage lent; la littérature signale aussi une décomposition à 344° C[2]. La thyroxine, chauffée à raison de 10 degrés par minute fond à 250° C; chauffée à raison de 3 degrés par minute, elle fond à 230—5° C[2].

C'est pourquoi dans le présent travail le comportement des acides aminés à la fusion a été observé 1° au cours d'un chauffage progressif et 2° au cours d'un chauffage brutal.

De plus, jusqu' ici, il a été très difficile d'obtenir des acides aminés purs. Et c'est grâce à l'efficacité de la méthode chromatographique[3] appliquée à la séparation de mélanges, à la purification de corps isolés, qu'un progrès a pu être réalisé. Des échantillons très purs d'acides aminés peuvent être obtenus, à présent.

D'autre part, les récentes méthodes microchimiques de *Kofler*, praticables sur de petites quantités de substances, même sur quelques cristaux, permettent de nouvelles investigations dans l'étude du comportement à la fusion. Elles rendent possible des modifications des conditions de chauffage des substances, apportent dans les observations des phénomènes plus de netteté, surtout dans le cas des substances fragiles.

Vu le comportement à la fusion des acides aminés, nous avons voulu préciser avec ces nouvelles méthodes, dans la mesure du possible, les données de la littérature au sujet des *températures de fusion* de ces substances. Nous avons aussi recherché les *eutectiques* que ces acides aminés pourraient former entre eux ou avec d'autres substances organiques. Ces eutectiques fondent à température plus basse que les substances mises en jeu et, par conséquent, font courir aux acides aminés moins de risques de décomposition au cours du chauffage. Il était à prévoir que les eutectiques seraient plus caractéristiques et conviendraient mieux à l'identification des acides aminés.

Température de fusion des acides aminés et de leurs principaux dérivés.

Acides aminés		Température de fusion des dérivés en °C										
Désignation	T. F. °C	p-toluène-sulfonyl	phénylurée	benzoyl	acétyl	formyl	picrate	picrolonate	α-naphtyl-urée	3,5-di-nitro-benzoyl	β-naphta-lène-sulfonyl	phényl-hydan-toïne
β-Alanine	196		168 (174)							202,5		
Ac. glutamique dl	199 (192)			155—7				184 d				165
Citrulline l	226											
Thyroxine dl	231—3											
Glycine	232	150 (147) (146)	197 (163)	187,5	206	153—4	200	214—5 d	191	179	159	
Arginine dl	238						232	248 (231)			85 (85—120)	
Thréonine dl	253			176 (mono) 174 (di)								
Cystine l	260 d	204—5 (di)	160	181 (di)						180 d	226—30	117
Ac. aspartique dl	280			165				130 d				
Histidine l	288 (253)	202—4 d		230 d (mono)			86	232 (mono) 265 d (di)		189	149—50	
Tryptophane l	290	176	166				195—6	203—4	159—60	233 d	185	
Norleucine d	301										149	
Créatine	303											
Créatinine	305 d						220					
Norvaline l	305					137						

Étude du comportement des acides aminés à la fusion et de leurs possibilités de sublimation.

Les travaux se sont poursuivis d'une part au *microscope polarisant à plaque chauffante* décrit par *L.* et *A. Kofler*[4].

L'échantillon peut être examiné en lumière ordinaire ou polarisée (nicols croisés). Dans ce dernier cas, les cristaux biréfringents rétablissent en partie la lumière et la fusion se marque par l'extinction du champ. Le comportement à la fusion, observé au microscope, a été étudié des deux manières suivantes:

—*A la suite d'un chauffage progressif:*

La préparation est déposée sur la plaque chauffante à environ 50° C. On élève la température à la vitesse de 4 degrés par minute jusqu'au moment où a lieu la fusion.

—*A la suite d'un chauffage brutal:*

La préparation est déposée sur la plaque chauffante dont la température est de 10 à 20° C plus basse que la température de fusion présumée de l'échantillon. La vitesse de chauffe est ensuite de 4 degrés par minute jusqu'au moment où a lieu la fusion.

Le début de fusion est la seule partie du phénomène qui ait un sens dans les déterminations faites avec des produits aussi facilement décomposables.

D'autre part, le *bloc chauffant*[5] a été utilisé pour les mesures des températures de fusion. Il a servi aussi à la préparation des sublimés*: sublimés d'acides aminés, purification de certaines substances intervenant dans l'étude des eutectiques.

Des acides aminés d'origines différentes ont été comparés: produits Kodak, British Drug Houses (pureté chromatographique), Preston.

Les résultats obtenus sont ceux des tableaux ci-dessous où les acides sont classés dans l'ordre généralement adopté dans la littérature[6].

Les remarques suivantes découlent de l'examen de ces tableaux:
—Les températures de fusion observées au microscope et au bloc chauffant sont en général très différentes de celles relevées dans la littérature.
—Des échantillons d'un même individu provenant de plusieurs sources présentent des différences de température de fusion. Cependant leurs eutectiques se sont révélés concordants, ce qui est en faveur d'une identité.
—Il se confirme que la facilité avec laquelle ces substances se décomposent empêche souvent la lecture exacte de la température de fusion, même avec le mode opératoire employé.

* Une plaque porte-objet est placée sur le bloc à une température inférieure d'une dizaine de degrés à la température de fusion de la substance à sublimer. A l'intérieur d'un petit anneau métallique déposé sur cette plaque, on introduit la substance. L'anneau est recouvert d'une lame porte-objet sur la surface inférieure de laquelle se dépose le sublimé.

Températures de fusion.

Acides aminés	Températures de fusion en ° C	Températures de début de fusion en ° C		
		Bloc chauffant	Microscope	
			Ch. brutal	Ch. progressif
Glycocolle Kodak	247—57 déc.[4]/232[2] 233 (225—30)[7]	déc. à partir de 235	240 déc.	240 déc.
β-Alanine Kodak	196[2]/196 déc.[7]	régression* de 194 à 191	194 déc.	191 déc.
Valine dl Kodak	298[2]/298 (292) déc.[7]	très sublimable	228	282? 232
Ac. ε-amino-caproïque Kodak	202—203[8]	215 déc.	205	205
Norleucine dl Kodak	327[2]/327 déc.[7]	> 260	env. 250 déc.	
Leucine dl Kodak	332[2]/332 déc. (290)[7]	très sublimable env. 230	242	242
Leucine l Preston	337[2]/295[7]	très sublimable env. 230	250	env. 240 déc.
Isoleucine dl Kodak	292[2]/292 déc.[7]	très sublimable env. 230	225	235
idem B. D. H.	idem	très sublimable env. 230	240	env. 250 déc.
Ac. aspartique dl Kodak	280[2] 278—80 déc.[7]	> 260	> 310 déc.	> 280
idem B. D. H.	idem	> 260	> 310 déc.	
idem Preston	idem	> 260	> 310 déc.	
Ac. glutamique l + Kodak	195—200[4]/224 déc.[2]/202 (198); 213 déc.[7]	régression de 218 à 193	194	190
Méthionine dl Kodak	272[2]/281[7]	déc. vers 250	déc.	env. 220 déc.
Cystine l — Kodak	260 déc.[2]/258—61 déc.[7]		> 275 déc.	> 275 déc.
β-Phénylalanine dl Kodak	318—20 déc.[7]	très sublimable env. 250	220 déc.	210 déc.
Tyrosine l Kodak	314—18 déc.; 290; 334[2]/295 déc.[7]		245 déc.	250 déc.

* Régression: la limite solide/liquide régresse au cours de la détermination.

Etude des sublimés.

Acides aminés	Début de fusion en °C Microscope	Remarques Sublimés (au bloc chauffant)
Glycocolle Kodak	229/228,5/224	sublimation vers 140—45° grains et bâtonnets
β-Alanine Kodak	202/197/193	sublimation vers 180—90° macles
Valine dl Kodak	228/221,5/220/184?	sublimation vers 185° polygones, oursins
Ac. ε-amino-caproïque Kodak	201/200,5	sublimation vers 190—200°
Leucine dl Kodak	185/188/186	sublimation vers 185° oursins, aiguilles radiées
Isoleucine dl Kodak	210/200/210	sublimation vers 180°
Ac. aspartique dl Kodak		pas de sublimation
Ac. glutamique l + Kodak	198/197/198 déc.	sublimation vers 180—90°
Méthionine dl Kodak	220/213/216,5	sublimation vers 170° oursins
Cystine l — Kodak		pas de sublimation
β-Phénylalanine dl Kodak	189/187/223	sublimation vers 160—70° polygones
Tyrosine l — Kodak	240/245/240	sublimation vers 240° aiguilles radiées, en forme de fil barbelé

L'expérience acquise nous permettra peut-être d'apporter certaines améliorations à ce mode opératoire.

Jusqu'ici les indications relevées sur le comportement des sublimés ne constituent pas de critères meilleurs pour l'identification des acides étudiés. —Nous avons envisagé l'étude des eutectiques que les acides aminés et d'autres substances formeraient entre eux, dans le but de trouver de nouveaux critères de caractérisation.

Essais d'identification des acides aminés par la température de fusion de leurs eutectiques.

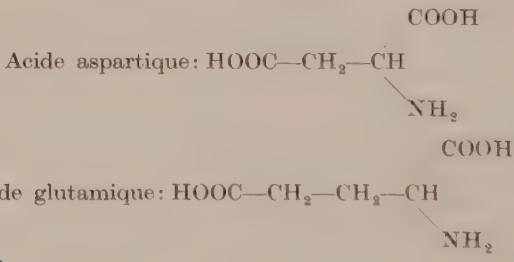
Les essais sont réalisés sur les acides aminés mélangés entre eux ou bien à des substances organiques de caractères fonctionnels différents. L'étude du comportement de ces mélanges à la fusion se réalise en mélangeant et broyant entre deux lames porte-objet des quantités égales des deux substances. Une petite portion de ce mélange est utilisée pour chaque mesure.

Les essais d'orientation se réalisent au *bloc chauffant*. Après avoir étalé la préparation sur un intervalle convenable, on note la température du début de fusion où coexistent les deux phases (limite solide-liquide/solide). C'est la température de fusion eutectique du mélange. Les résultats de ces mesures sont précisées au *microscope à plaque chauffante*. Une petite portion du mélange, placée entre lame et lamelle, est déposée sur la plaque chauffante qui se trouve à une température inférieure d'environ 50° C à la température présumée de l'eutectique, préalablement déterminée au bloc chauffant. La vitesse de chauffe adoptée alors est de 4 degrés par minute. On note la température du début de fusion. Les lectures se font en lumière ordinaire.

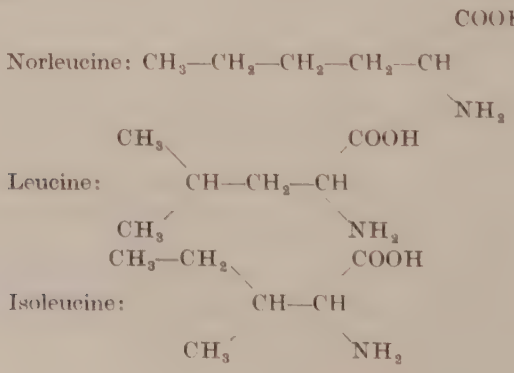
Un autre procédé est utilisé pour l'étude des eutectiques sous le microscope. C'est celui du contact, décrit dans l'ouvrage de *L.* et *A. Kofler*[4]. Les observations se font alors en lumière polarisée, entre nicols croisés. La nécessité d'effectuer une fusion et recristallisation des deux substances, avant l'examen au microscope, ne permet pas l'application de ce dernier procédé dans le cas des acides aminés, décomposables à la fusion.

On a choisi pour l'examen des constantes les trois groupes suivants qui se retrouvent dans presque toutes les séparations. Ces acides à structure moléculaire très semblable se retrouvent en général groupés dans les hydrolysats. La méthode chromatographique a contribué fortement à leur séparation[3].

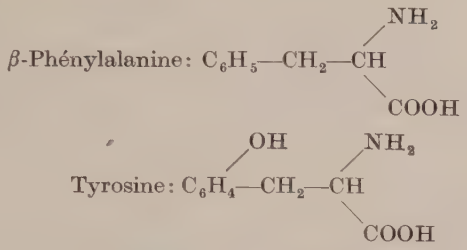
1er groupe:



2ème groupe:



3ème groupe:



Les trois tableaux ci-dessous donnent les résultats obtenus dans la recherche des eutectiques pour les trois groupes cités plus haut.

De l'examen du premier tableau, il ressort:

—Que les températures de fusion des eutectiques apparaissent plus typiques que les températures de fusion des acides aminés purs.

—Que les températures de fusion des eutectiques sont en général décelables à 1° C près.

—Qu'il y a moyen de caractériser les deux acides de ce 1er groupe par leurs *eutectiques binaires* avec les substances suivantes: β-alanine, hydroquinone, thiourée, salophène, acide hippurique, saccharine, atophan.

—Qu'une régression de la fusion au bloc chauffant s'observe souvent. Ceci étant dû à l'instabilité des acides aminés.

Il faut attirer l'attention sur le fait que la mesure faite au bloc chauffant est souvent plus élevée que celle faite au microscope. En conséquence, certains résultats obtenus au microscope peuvent échapper au bloc chauffant. Tels les eutectiques obtenus avec le salophène, la saccharine. Ceci met en évidence la nécessité de combiner les deux techniques.

De l'examen du deuxième tableau, il ressort:

—Qu'il y a moyen de caractériser les trois acides de ce 2ème groupe par leurs *eutectiques binaires.*

—Que les températures de fusion des eutectiques sont en général décelables à 1° C près.

—Que pour différencier les trois acides les uns des autres, on a à sa disposition les eutectiques formés avec les substances suivantes: urée, acide diiodohippurique, 2,4-dinitro-phénylhydrazine. Pour caractériser l'isoleucine on peut utiliser les eutectiques formés avec le mannitol et la thiourée.

Il est possible de combiner les renseignements recueillis dans ce tableau dans le but d'identifier un des trois acides de ce 2ème groupe.

De l'examen du troisième tableau, il ressort:

—Que les températures de fusion des eutectiques sont en général décelables à 1° C près.

Température de fusion des eutectiques.
Groupe acide aspartique dl (Kodak)-acide glutamique l + (Kodak).

Substances formant eutectiques binaires avec les ac. aminés T. F. ° C: bloc	micr.	Acide aspartique dl T. F. ° C: bloc: > 260 micr.: > 310 eutect. binaires: T. F. ° C: bloc	micr.	Acide glutamique l + T. F. ° C: bloc: 218—193 micr.: 194 eutect. binaires: T. F. ° C: bloc	micr.
Ac. malonique 134,5	131—136	117/117	102/99/98/99	peu net env. 90/env. 96	accident au thermomètre
Ac. succinique 188	188	185/185	180/177/177	181/180/181	171/171/171
Ac. tartrique 171	164—171	150/149	142/143/141	141/140	135/135/135
Glycocolle déc.	240	régression et déc. 209/210	202/202/202,5 déc.	—	—
β-Alanine 194—191	194	régression de 165 à 155	156,5/156/ 155,5	régression de 190 à 170	164/163,5/ 163/163
Ac. ε-amino-caproïque 215 déc.	205	162/160/160	141/145/148 peu net	162/163/163	155/154,5/154
Hydroquinone 173	173	—	—	—	170/166/166/ 167/170/166/ 170
Ac. p-hydroxybenzoïque 217	214	—		—	187/184/182/ 182
Urée 134,5	135	129/129/129/ 128,5/129	126/126/126	128/130/130/ 130/130	126/126/126
Thiourée 179	174—178,5	—	—	—	168.5/170/169
Dicyandiamide 210	210—212	déc. et régression	172/171/170,5 171,5/168/169 169/168	déc. et régression de 187 à 177	167/167,5/167 162? déc. Kofler: 169
Salophène 190	190	—	—	—	187/187/187 187/ Kofler: 187
Ac. hippurique 190	184—190	—		183/183/184 184/185/185/ 185,5 peu net	175/175/174,5 175,5
Ac. diiodohippurique 222	209—218		—	régression de 220 à 185	187/191/188/ 189/185/peu net
Saccharine 228	228		222/218/219/ 218		187/186/185/ 185
Atophan 212	202—213	—	—	—	190/190/189/ 188,5/189,5
Diméthylglyoxime subl.	234		219? forte sublimation		198/190/191? forte sublim.

Température de fusions des eutectiques.
Groupe norleucine dl, leucine dl, isoleucine dl (Kodak).

Substances formant eutectiques binaires avec les ac. aminés T. F. ° C: bloc	micr.	Norleucine dl T. F. ° C: bloc: > 260 micr.: + 250 déc. eut. bin. T. F. ° C: bloc	micr.	Leucine dl T. F. ° C: bloc: subl. micr. 242 eut. bin. T. F. ° C: bloc	micr.	Isoleucine dl T. F. ° C: bloc: subl. micr. 225 eut. bin. T. F. ° C: bloc	micr.
Glucose 146			135		138/139		136/138
Lactose 201			165/166		162/164		164,5
Mannitol 168	167		—	—	—	—	163,5/163,5 164
Ac. salicylique 161	154,5—157		145/144/141	152/152/152/ 151,5	145/140/135/ 134/146 peu net	149/149,5/ 148,5	131/140/140/ 140 peu net
Ac. p-hydroxybenzoïque 217	214		189	208/208,5 déc.	(189) 205 (189) 205	régression 212/ 212/213/213	—
Urée 134,5	135		—	—	123/123/123	—	126/126
Thiourée 179	174—178,5	—	—	—	—	174/174	168/168
Dicyandiamide 210	210—212	192	183/189	203/203/203,5/ 203,5	194/192/192	187/187/187/ 188/188,5/ 188,5	190/189 mesures incertaines
Salicylamide 140,5	135—141	—	—	134/135,5/ 135,5	—	—	—
Ac. hippurique 190	184—190	176	170	180/180/180/ 180,5/178,5	173/173/174	173/173/173/ 174/174/174,5	169/169/168
Ac. diiodohippurique 222	209—218	206	200/197/197	209/209/209	203/203/204	198/198/198	190/190/190/ 192
Chloracétamide 118—116	116		—	116 et régression	110/109/109 peu net	régression de 100 à 95	très peu net
Saccharine 228	228	192	186	207/207/207,5/ 208 régr. →200	191/188/187/ 187,5	185/185/185/ 186/186/186 régr. → 181	175/172/172/ 171
Atophan 212	202—213		—	—	—	207/207/207,5/ 208	—
2,4-dinitrophénylhydrazine 204	195—202		179/175	200/200/201/ 201 pas net	189/185/187	—	184/184

Température de fusion des eutectiques.
Groupe β-phénylalanine dl (Kodak)-tyrosine l — (Kodak).

Substances formant eutectiques binaires avec les ac. aminés T. F. ° C: bloc	micr.	β-Phénylalanine dl T. F. ° C: bloc: env. 250 micr.: 220 déc. eutect. binaires: T. F. ° C: bloc	micr.	Tyrosine l —* T. F. ° C: bloc: micr.: 245 déc. eutect. binaires: T. F. ° C: bloc	micr.
Ac. oxalique** 189			130/129/129	env. 94	72/69/69/71/ 70/68,5/69/71
Ac. malonique 134,5	131—136	102/100/99	105/105/103	124/125	121/119/119
Ac. succinique 188	188	163/163	159/158/158,5	—	182/185/182/ 183
Ac. tartrique 171	164—171	142/140	130/129/126/ 130	161/161	156/156
Ac. ascorbique 192	186—193	env. 160	159/159/160	env. 184	180/181/181
Ac. o-hydroxy-benzoïque 161	154,5—157	149/149/149,5/ 149,5/150	140/139/139	—	—
Ac. p-hydroxy-benzoïque 217	214	—	202/197/197/ 197	—	208/208/207
Urée 134,5	135	130/130	125/124/124	—	—
Thiourée 179	174—178,5	175/176/175	166/163/163	—	—
Dicyandiamide 210	210—212	régression de 200 à 195, déc.	183,5/183/183		201/201/200,5 199,5/déc.
Ac. hippurique 190	184—190	177/177/177/ 177/178/178	159/158/160	—	
Ac. diiodohippurique 222	209—218	197/198/198	184/186/185		
Saccharine 228	228	189/189/189/ 190/190/légère régression	176/172/172/ 172/peu net sublimation		215/217/216
Diiodoxyquinoléine > 310		env. 210	187/187/187	—	—
2,4-dinitrophényl-hydrazine 204	195—202	régression de 202 à 180	177/179/177/ 180/peu net		197/197/196

* Eviter le contact de l'humidité au cours des manipulations.
** Sublimer l'acide oxalique avant la préparation de l'eutectique.

—Qu'il y a moyen de caractériser les deux acides de ce 3ème groupe par leurs *eutectiques binaires* avec les substances suivantes: acides oxalique, malonique, succinique, tartrique, ascorbique, o et p-hydroxybenzoïque, urée, thiourée, acides hippurique et diiodohippurique, diiodoxyquinoléine.

Conclusions.

Ce travail est une première contribution à l'étude des *constantes physiques à la fusion* des acides aminés purs.

Plusieurs fonctions ont été opposées à quelques acides aminés dans le but d'obtenir des *eutectiques* permettant de les identifier.

Il ressort de l'examen des résultats, qu'il est possible de différencier des acides aminés d'un même groupe à l'aide de la température de fusion de leurs eutectiques lue au microscope et au bloc chauffant.

Ces résultats résolvent simplement et avec précision un problème de l'analyse fonctionnelle sans recourir à la formation de dérivés.

Les eutectiques signalés sont intéressants pour le contrôle de pureté de ces acides aminés.

Les résultats doivent être complétés par une investigation quantitative qui permettrait le dosage d'acides aminés en mélanges et le microdosage de contaminations d'acides entre eux.

Le travail se poursuit par l'étude des indices de réfraction à différentes températures et par l'étude des densités.

D'autres acides aminés seront examinés.

Remerciements.

Je tiens à remercier ici le Fonds National de la Recherche Scientifique pour les subsides qui m'ont été accordés et qui ont permis la réalisation de ce travail.

J'exprime ma gratitude à Mlle. *A. Lacourt*, Directrice du Service Universitaire de Microchimie de l'Université de Bruxelles, pour les facilités et les conseils qu'elle m'a donnés au cours de ces recherches, ainsi que pour le matériel et les produits qu'elle a mis à ma disposition.

Je remercie encore Mlle. *Claudine Francotte*, Lincenciée en Chimie, Mlle. *Claire Dussart* et Mr. *Marcel Debrus*, étudiants en Pharmacie, pour leur collaboration.

La Compagnie Liebig d'Anvers a offert gracieusement quelques échantillons d'acides aminés; je l'en remercie.

Résumé.

Les constantes physiques à la fusion sont préconisées comme moyen d'identification des acides aminés.

Les méthodes microchimiques de *Kofler* ont permis d'obtenir des résultats. L'étude des températures de fusion des acides aminés purs

a révélé une amélioration des données de la littérature, sans toutefois permettre de préconiser cette constante comme moyen d'identification.

Les températures de fusion des eutectiques ont donné des résultats plus encourageants. Des valeurs définies ont été obtenues qui pourraient être utilisées pour l'identification de chaque individu. La netteté des lectures et la précision des mesures sont très satisfaisantes.

Zusammenfassung.

Die physikalischen Konstanten von Aminosäure-Schmelzen wurden zur Identifizierung dieser Substanzen vorgeschlagen. Mit Hilfe der *Kofler*schen Mikromethoden durchgeführte Untersuchungen der Schmelztemperaturen reiner Aminosäuren führten zwar zu einer Verbesserung der in der Literatur angegebenen Werte, ohne daß jedoch diese Kennzahlen zur Identifizierung solcher Verbindungen empfohlen werden könnten. Die Schmelzpunkte eutektischer Gemische geben besser verwertbare Resultate. Es konnten gut definierte Werte beobachtet werden, die sich zur Identifizierung jeder einzelnen Verbindung dieser Reihe verwenden lassen. Die Eindeutigkeit und Genauigkeit der Messungen ist durchaus befriedigend.

Summary.

Physical constants are recommended as means of identifying amino acids. With the micro *Kofler* methods the melting temperature of these compounds is more accessible than previously. Better, however, are the melting temperatures of eutectics to identify amino acids. The accuracy of the rendings is very satisfactory.

Bibliographie.

[1] *L. Velluz*, Substances naturelles de synthèse. Paris: Masson et Cie. 1951.

[2] *N. D. Cheronis* et *J. B. Entrikin*, Semimicro Qualitative Organic Analysis. p. 271, 416. New York: Th. Crowell Co. 1947.

[3] *L. Zechmeister*, Progress in Chromatography 1938–1947. p. 139. London: Chapman & Hall. 1950. *A. J. P. Martin*, Endeavour **6**, 21 (1947).

[4] *L.* et *A. Kofler*, Mikromethoden zur Kennzeichnung organischer Stoffe und Stoffgemische. Innsbruck: Wagner. 1948.

[5] *A. Lacourt*, J. Pharmacie Belgique, n° 1 & 2, janvier-février 1952. Industrie chimique Belge **17**, 217 (1952). Revue de médecine et de pharmacie (Belgique), Section de Pharmacie, n° 1, 1952.

[6] *M. Polonovsky*, Biochimie médicale. p. 101. Paris: Masson et Cie. 1948.

[7] *C. D. Hodgman*, Handbook of Chemistry and Physics. Cleveland, Ohio: 1947.

[8] *S. Gabriel* et *Th. A. Maass*, Ber. dtsch. chem. Ges. **32**, 1269 (1899).

Aus dem Laboratorium der Allgemeinen Chemie G. m. b. H., Graz, und dem Analytischen Laboratorium der N. V. Philips' Gloeilampenfabrieken, Eindhoven.

Mikrotitrationen mit Äthylendiamintetraessigsäure. VIII.

Die Bestimmung von Thorium und Aluminium.

Von

H. Flaschka*, K. ter Haar und J. Bazen**.**

(Eingelangt am 29. Juni 1953.)

Wie die Untersuchungen von *Cabell*[1] ergeben haben, bildet Thorium bei Wasserstoffionen-Konzentrationen von etwa 10^{-3} und weniger einen ziemlich stabilen Komplexonkomplex, der entgegen dem Verhalten des ersten Elementes der 4b-Gruppe, nämlich des Titans[2], eine Hydroxydfällung z. B. durch Ammoniak verhindert. Man kann Komplexonmaßlösungen unter bestimmten Bedingungen mit Thorium titrieren[5] und die Umkehrung dieser Titration auch zur maßanalytischen Bestimmung von Thorium heranziehen. Eine kurze Mitteilung über diese Möglichkeit erschien während der experimentellen Arbeiten zu dieser Veröffentlichung von anderer Seite in Form eines Vortragreferates[3]. Obwohl die Bildungskonstante von Aluminium-Komplexonat von derselben Größenordnung ist wie die von Thorium-Komplexonat, wäre es doch vielleicht möglich, Aluminium auf diese Weise zu titrieren[4], indem man einen zugesetzten Komplexonüberschuß mit Thoriummaßlösung zurücktitriert, wobei man Alizarin S als Indikator verwendet. Da unsere Versuche (*K. ter Haar* und *J. Bazen*) gezeigt haben, daß es möglich ist, Aluminium im Makromaßstab auf diese Weise zu titrieren, schien es angebracht, dieses Verfahren auch im Mikromaßstab zu prüfen (über die Makrobestimmung von Aluminium, Nickel und Wismuth wird an anderer Stelle von uns berichtet werden).

Die Titration findet am besten in einem p_H-Bereich von etwa 3 bis 5 statt. Unterhalb von $p_H \sim 2{,}5$ wird die Stabilität des Thoriumkom-

* Allgemeine Chemie G. m. b. H., Graz/Österreich.

** Analytisch Laboratorium, N. V. Philips' Gloeilampenfabrieken, Eindhoven/Holland.

plexonates rasch so gering, daß zur vollständigen Bindung des Thoriums mehr als die stöchiometrische Komplexonmenge nötig ist. Oberhalb von $p_H \sim 5$ ist einerseits die Komplexbildung schon sehr langsam, wodurch der Endpunkt der Titration schleppend wird, und überdies stört dann die Farbe des Alizarins. Noch bei $p_H = 4{,}8$ kann jedoch die Titration einwandfrei durchgeführt werden, wenn man in heißer Lösung arbeitet. Zur Bestimmung des Thoriums muß man ebenfalls den Weg der Rücktitration wählen, da bei der nötigen Wasserstoffionenkonzentration Thorium bereits als Hydroxyd oder basisches Salz ausfiele. Zur Rücktitration benötigt man wie bei der Bestimmung des Aluminiums eine Thoriumlösung bekannten Titers, der jedoch keineswegs gravimetrisch oder durch Einwaage gestellt werden muß, sondern durch Titration gegen die Standardkomplexonlösung bestimmt wird.

Von der Mitteilung einiger Thoriumbestimmungen kann hier abgesehen werden; denn es genügt, eine Serie von Titrationen von Komplexon mit Thoriumnitratmaßlösung anzuführen, um die hierbei erzielbare Genauigkeit darzustellen.

Reagenzien:

Komplexon, 0,0100-m: 3,722 g Komplexon III werden mit Wofatitwasser zu 1 l gelöst.

Thoriumnitrat, zirka 0,01-m: 5,5 g $Th(NO_3)_4 \cdot 4\,H_2O$ werden zu 1 l gelöst.

Alizarin S, 0,1% in Wasser.

Kaliumbiphthalat, p. a., fest.

Essigsäure, p. a., 2-m.

Natriumacetat, p. a., 1-m.

Titerstellung der Thorium-Lösung.

Die Komplexonlösung wird mit 2 bis 3 Spatelspitzen Kaliumbiphthalat oder je 2 bis 3 ml 2-m Essigsäure und 1-m Natriumacetat gepuffert, auf 25 bis 30 ml verdünnt und zum Sieden erhitzt. Nach Zugabe von 5 bis 8 Tropfen Indikatorlösung wird mit Thoriumnitrat auf rot und dann mit Komplexon wieder auf rein gelb titriert oder man titriert sofort mit Thoriumnitrat auf eben rot.

Thorium-Bestimmung.

Genau wie bei dieser Titerstellung der Thoriumlösung verfährt man zur Thoriumbestimmung. Man fügt zur Probelösung einen Überschuß an Komplexon, verdünnt, puffert und titriert die heiße Lösung erst mit Thoriumstandard auf rot und dann mit Komplexon auf gelb zurück.

In Tabelle 1 sind die Resultate einer Serie von Titrationen angeführt und man kann ersehen, daß in keinem Falle ein größerer Fehler als 0,3% zu verzeichnen ist.

Tabelle 1. Ermittlung des Titers einer Thoriumnitratlösung gegen 0,0100-m Komplexon.

Th-Lösung ml	Komplexonlösung ml	F_{Th}	% Abweichung vom Mittelwert
1,10	1,12	1,0182	+ 0,12
1,39	1,41	1,0144	— 0,26
2,71	2,75	1,0147	— 0,23
4,03	4,10	1,0174	+ 0,04
5,68	5,79	1,0194	+ 0,14
7,32	7,45	1,0178	+ 0,08
9,65	9,82	1,0175	+ 0,05
		1,0170	

Al-Bestimmung.

Die neutrale oder ganz schwach saure Probelösung eines Aluminiumsalzes wird mit einem Überschuß an 0,01-m Komplexon versetzt und mit einigen Spatelspitzen Kaliumbiphthalat oder mit je 2 bis 3 ml 2-m Essigsäure und 1-m Natriumacetat gepuffert und auf 25 bis 30 ml verdünnt. Sodann erhitzt man zum Sieden und titriert nach Zugabe von 5 bis 8 Tropfen Indikator mit 0,01-m Thoriumlösung auf eben rot und bringt mit Komplexon auf rein gelb.

In der Aluminiumlösung kann vorher allenfalls vorhandenes Eisen gegen Thiocyanat komplexometrisch bestimmt werden (Titration bei p_H 2 bis 3 in der Hitze).

Wurden die Sesquioxyde im Zuge eines Analysenganges als Hydroxyde gefällt, so werden sie nach dem Waschen im Zentrifugenröhrchen mit etwas Salzsäure gelöst. Die Lösung wird gegen eine möglichst geringe Menge Tropäolin 00 ($p_H \sim 1$) mit Ammoniak neutralisiert und anschließend werden Eisen und Aluminium nach entsprechender Pufferung titriert. Tropäolin soll eben nur so viel genommen werden, als zur Durchführung der Neutralisation nötig ist; andernfalls wird für die Titrationen ein störender gelber Hintergrund geschaffen.

Tabelle 2.

µg Aluminium		
gegeben	gefunden	Differenz
90	89	— 1
	89	— 1
	84	— 6
	100	10
95	94	— 1
	92	— 3
	99	4
180	184	4
190	192	2
	189*	— 1
	190*	0
270	270	0
	244	— 26
475	475*	0
	472	— 3
	483	8
949	939*	— 10
	946	— 3

Berechnung:

$$(A \cdot M_K - B \cdot M_T) \cdot 26{,}97 = \text{mg Al.}$$

In dieser Gleichung bedeuten A und B die verbrauchten ml Komplexon bzw. Thoriumnitratmaßlösung und M_K sowie M_T die Molaritäten der betreffenden Lösungen.

Über die Resultate solcherart durchgeführter Aluminiumbestimmungen informiert Tabelle 2. Die mit einem Sternchen versehenen Bestimmungen wurden nach der Neutralisation von zugefügten 5 ml Salzsäure (1:1) ausgeführt. Die Aluminiumlösungen wurden durch Einwaage von analysenreinem Kalium-Aluminium-Alaun hergestellt und der Aluminiumgehalt aus der Einwaage berechnet.

Die Methode liefert recht brauchbare Werte. Bei Aluminiummengen über 1 mg findet man mehr und mehr Unterwerte in der Größenordnung von 1 bis 2%.

Zusammenfassung.

Es wird über die komplexometrische Bestimmung von Aluminium und Thorium berichtet. Man versetzt die Probelösung mit einem Überschuß von Komplexonlösung und titriert diesen nach Puffern auf $p_H \sim 4$ in der Siedehitze mit einer gestellten Thoriumnitratlösung gegen Alizarin S zurück.

Summary.

A report is given of the complexometric determination of aluminium and thorium. The test solution is treated with an excess of complexon solution, and after buffering to $p_H \sim 4$, the solution is titrated back at the boiling temperature with a standardized thorium nitrat solution in the presence of alizarin S.

Résumé.

On présente un dosage complexométrique de l'aluminium et du thorium. On traite la solution à doser par un excès de solution de complexone et la titre à l'ébullition après avoir tamponné à $p_H \sim 4$ par retour avec une solution de nitrate de thorium et l'alizarine S.

Literatur.

[1] *M. J. Cabell*, Analyst **77**, 866 (1952).

[2] *R. Přibil* und *P. Schneider*, Coll. trav. chim. Tchécoslovaquie A **5**, 886 (1950).

[3] *J. S. Fritz* und *J. J. Ford*, Pittsburg Conf., March 1953, Analyt. Chemistry **25**, 521 (1953).

[4] *K. ter Haar*, Diskussion des Vortrages von *M. J. Cabell*, Oxford 1952, Analyst **77**, 866 (1952).

[5] *K. ter Haar* und *J. Bazen*, Analyt. Chim. Acta **9**, 235 (1953).

Aus dem II. Chemischen Laboratorium der Universität Wien.

Mikrobestimmung primärer Aminogruppen in aliphatischen und aromatischen Verbindungen, in Aminosäuren und Peptiden, sowie in Carbonsäureamiden und Sulfonsäureamiden.

Von

Gerald Kainz.

Mit 1 Abbildung.

(Eingelangt am 29. Juni 1953.)

Bei der Konstitutionsermittlung organischer Verbindungen ergibt sich oftmals die Notwendigkeit, den Gehalt einer Substanz an primären Aminogruppen qualitativ und quantitativ zu erfassen. Sucht man in der Literatur nach einem allgemein anwendbaren Verfahren, so muß man feststellen, daß lediglich, je nach der Bindung der Aminogruppe, spezielle, zum Teil oft nur präparative Arbeitsvorschriften existieren (vgl. *H. Meyer*[1]). Den weitesten Anwendungsbereich besitzt noch das Verfahren von *van Slyke*[2,3], das ursprünglich für Aminosäuren und Eiweißspaltprodukte ausgearbeitet, größtenteils auch für aliphatische Aminogruppen anwendbar ist. Aromatisch gebundene Aminogruppen, Carbonsäure- und Sulfonsäureamidgruppen, sowie Aminogruppen in Heterocyclen sind damit kaum erfaßbar[4].

Für die vorliegende Arbeit habe ich mir daher die Aufgabe gestellt, die Einwirkung von salpetriger Säure auf primäre Aminogruppen, gleich welcher Bindung, zu untersuchen und auf Grund der Ergebnisse ein möglichst allgemein anwendbares Verfahren zur Bestimmung der primären Aminogruppe zu entwickeln.

Reaktive Grundlagen und bisherige Befunde.

Läßt man salpetrige Säure im Überschuß auf ein primäres Amin einwirken, so bildet sich zunächst ein Diazoniumsalz (1), das — mehr oder minder schnell — in die entsprechende Oxyverbindung und in Stickstoff zerfällt (2). Pro Mol primäres Amin gelangt ein Mol Stickstoff

zur Messung. Sekundäre und tertiäre Amine hingegen liefern keinen Stickstoff.

$$[R—NH_3]^+ Cl^- + HONO \rightarrow [R—N{\equiv}N]^+ Cl^- + 2\,H_2O, \quad (1)$$

$$[R—N{\equiv}N]^+ Cl^- + H_2O \rightarrow R—OH + N_2 + HCl. \quad (2)$$

Verfolgt man nun diese Reaktion mit Hilfe der üblichen *van Slyke*-Apparatur, die bekanntlich nur ein Arbeiten bei Zimmertemperatur ermöglicht, so ergibt sich folgendes Bild:

Primäre *aliphatische* Aminogruppen reagieren besonders schnell, wenn sie einer Carboxylgruppe benachbart sind (α-Aminosäuren), dagegen langsam bei ε-Stellung. Ist keine Carboxyl- oder Carbonylgruppe vorhanden, so kann die Stickstoffabspaltung oft ein bis zwei Stunden erfordern (z. B. Methylamin). Kein Stickstoff ist z. B. aus der primären Aminogruppe des Guanidylrestes im Arginin erhältlich. Das aus primären *aromatischen* Aminen entstehende Diazoniumsalz ist bei 20° so beständig, daß kein Stickstoff entwickelt wird.

Die primäre Aminogruppe in *Säureamiden* reagiert zwar nach obiger Gleichung, doch verläuft die Abspaltung des Stickstoffs bei 20° nur äußerst langsam (z. B. Harnstoff: 8 Stunden). Einige Säureamidgruppen, wie die des Asparagins, reagieren scheinbar gar nicht. Primäre Aminogruppen an *heterocyclischen* Ringen geben mit salpetriger Säure mehr oder minder beständige Diazoniumverbindungen; die Stickstoffentbindung ist daher bei 20° meist nicht quantitativ.

Diese Befunde zeigen, daß eine Lösung der gestellten Aufgabe mit der üblichen *van Slyke*-Apparatur, die sich für biologische Untersuchungen (Aminosäuren und Peptide) ausgezeichnet bewährt hat, *nicht* möglich ist. Es war daher notwendig, eine neue Apparatur zu entwickeln, die dem Gesamtreaktionsverlauf besser Rechnung trägt.

Entwicklung einer Apparatur zur Bestimmung primärer Aminogruppen.

Folgende Gesichtspunkte waren für eine Neukonstruktion maßgebend:

1. Die Reaktion soll nicht nur in der Kälte (wie bei *van Slyke*), sondern auch in der *Hitze* verfolgt werden können. Vorversuche wiesen darauf hin, daß eine Erhöhung der Reaktionstemperatur zu einer Abkürzung der Bestimmung, sowie zu einer quantitativen Reaktion vieler Aminogruppen führen könnte.

2. Der Stand der Desaminierung soll *ständig*, und zwar *ohne besondere Manipulation*, in einer Meßbürette verfolgbar sein. Die dazu nötige oftmalige Messung des entwickelten Stickstoffes ist aber nach dem bisherigen *van Slyke*schen Verfahren sehr umständlich, da das Stickstoff-Stickstoffoxyd-Gemisch jedesmal aus dem Reaktionsgefäß in die Hempelpipette und nach Absorption in die Meßbürette übergeführt werden muß. Es schien zweckmäßiger, von dem diskontinuierlichen Verfahren

abzugehen und ein Spülgas (Kohlendioxyd) zu verwenden, das den bei der Desaminierung entstehenden Stickstoff *fortlaufend* in ein Azotometer nach *Pregl* überführt.

3. Die organische Probe muß direkt — also ohne vorherige Lösung — in ein abnehmbares Reaktionskölbchen einbringbar sein; denn viele organische Substanzen lösen sich zunächst nur schlecht in Eisessig, gehen aber während des Diazotierungsvorganges in Lösung oder reagieren in heterogener Phase (z. B. synthetische Polypeptide).

Die für diese Anforderungen entwickelte Apparatur (vgl. Abb. 1) ist einer Dumasapparatur sehr ähnlich. Sie besteht aus einem Kohlendioxydentwickler und einem Azotometer, enthält jedoch an Stelle eines Verbrennungsrohres ein Reaktionsgefäß und — zur Absorption des Stickstoffoxyds — einen Wäscher. Mit Hilfe dieser Apparatur war es nun möglich, die Desaminierung primärer Aminogruppen entsprechend den oben gegebenen Richtlinien zu verfolgen.

Bereits im Jahre 1905 hat *E. Fischer*[5] unter Verwendung von Kohlendioxyd als Spülgas primäre Aminogruppen in Di- und Tripeptiden bestimmt. Die damalige Apparatur war jedoch noch umständlich und eine Analyse dauerte mehrere Stunden. Die erhaltenen Werte lagen oft um 50% zu hoch (teils bedingt durch ungenügende Absorption von Stickstoffoxyd, teils durch Verwendung von Mineralsäure statt Essigsäure bei der Desaminierung). Neuerdings wurde dieser Gedanke von *Hussey*[6] aufgegriffen. Da ähnliche Bauelemente und die gleichen Reaktionsbedingungen wie bei dem Verfahren von *van Slyke* verwendet werden, geht der Anwendungsbereich des abgeänderten Verfahrens nicht über die bisherige *van Slyke*-Bestimmung hinaus. Zum Zwecke der geplanten Aminostickstoffbestimmung, die möglichst allgemein anwendbar sein sollte, schien die genannte Apparatur nicht geeignet (vgl. obige Richtlinien).

Bestimmung der primären Aminogruppe in Aminosäuren und Peptiden.

Nach *van Slyke* reagieren die meisten Aminosäuren, von einigen Ausnahmen abgesehen, binnen 5 Minuten bei 20° unter quantitativer Stickstoffabspaltung. Mit der neuen Apparatur wurde die Desaminierung sowohl bei 20°, als auch — zwecks Untersuchung der Ausnahmen — bei 100° durchgeführt*. Bei den α-Aminosäuren genügte, in Übereinstimmung mit *van Slyke*, Reaktion bei 20°. Ein zur Kontrolle durchgeführter Hitzeversuch verursachte keine zusätzliche Stickstoffentwicklung, auch dann nicht, wenn gleichzeitig sekundärer Aminostickstoff (z. B. Histidin, Prolin, Oxyprolin) anwesend war. Die erhaltenen Ergebnisse waren ausgezeichnet (z. B. Histidin, Alanin, Threonin, Valin, Leucin, Isoleucin, Phenylalanin). ε-Aminogruppen, die bekanntlich bei

* Beim Heißversuch wird die Reaktionslösung 1 bis 2 Minuten auf 100° erhitzt. Der hierbei erhaltene Wert wird im folgenden kurz „Heißwert" genannt.

20° langsam reagieren (30 Minuten nach *van Slyke*), wurden beim Hitzeversuch *sofort* quantitativ erfaßt (z. B. Lysin). Während bei Arginin nach *van Slyke* lediglich die α-Aminogruppe reagiert (die zweite primäre Aminogruppe im Guanidinrest liefert keinen Stickstoff), konnte ich feststellen, daß bei 100° *beide* primäre Aminogruppen quantitativ Stickstoff abspalten. Ferner konnte beim Hitzeversuch auch die Säureamidgruppe des Asparagins, die bisher nicht auf salpetrige Säure anzusprechen schien, quantitativ bestimmt werden.

Von Interesse waren ferner die Aminosäuren, die nach *van Slyke* abnormal reagieren: Glycin, Cystin, Cystein, Serin und Tryptophan.

Glycin und Glycylpeptide: Nach *van Slyke* liefert Glycin bei einer Reaktionszeit von 5 Minuten 103%, bei einer Stunde 135% des erwarteten Stickstoffes. Ebenso ergeben auch alle Glycylpeptide, bei denen die Aminogruppe des Glycylrestes nicht substituiert ist (z. B. Glycylasparagin, Glycylphenylalanin, Diglycylalanin) durchwegs um 35% höhere Werte als berechnet (*Abderhalden* und *van Slyke*[7]). Hingegen verhalten sich N-substituierte Glycylpeptide (z. B. Alanylglycin) normal.

Mit der neuen Apparatur konnte ich — sofern ich die gleiche Desaminierungslösung wie *van Slyke* verwendete — obige Angaben bestätigen. An der Größe der Stickstoffblasen im Azotometer ließ sich erkennen, daß die Hauptreaktion zwischen Glycin und salpetriger Säure nach 10 bis 15 Minuten abgeklungen ist. Statt der erwarteten Mikroblasen war jedoch eine weitere, geringe Gasentwicklung (zufolge einer Nebenreaktion) zu beobachten. Erst nach Erhitzen wurden Mikroblasen erhalten. Das gefundene Volumen betrug bei Glycin und Glycylpeptiden etwa 160% der Theorie.

Über die *Sekundärreaktion* sind bereits zahlreiche Untersuchungen[8–14] angestellt worden. Zunächst wurde festgestellt, daß sich nur ein Teil der zu erwartenden Glykolsäure bildet. Das entwickelte Gas enthält neben Stickstoff noch Distickstoffoxyd und Kohlendioxyd. Als man in der Reaktionslösung zirka 2,8% Oxalsäure, bzw. Oxalylpeptide fand, nahmen einige Autoren[10,12] an, daß die Nebenreaktion auf die Oxydationswirkung der salpetrigen Säure zurückzuführen wäre, die dabei reduziert wird. Jedoch ergaben Verbindungen, die als Zwischenstufe der Oxydation denkbar sind, wie Glykolsäure, Glyoxylsäure und Ameisensäure, keine Stickstoffentwicklung.

Eine *Klärung der Nebenreaktion* bei Glycin und Glycylpeptiden scheint nun durch eine ausgezeichnete Arbeit von *Austin*[13] gegeben. Demnach verläuft die Desaminierung von Aminosäuren über ein Carbeniumion*, das wohl hauptsächlich mit Wasser (unter Bildung der ent-

* Auch nach *W. Hückel*[15] treten bei Umsetzung von Aminen mit salpetriger Säure nach Zerfall des einfach positiv geladenen Diazoniumkomplexes vorübergehend *Ionen* auf.

sprechenden Oxyverbindung), teilweise aber auch mit anwesenden negativen Ionen, wie NO_2', reagiert. Speziell bei Glycin entsteht Nitroessigsäure, die der Ausgangspunkt für die Sekundärreaktion ist. Zum Teil zersetzt sich diese in Nitromethan, das auch isoliert wurde, und Kohlendioxyd; zum Teil erfolgt weitere Reaktion mit überschüssiger salpetriger Säure zu Methylnitrolsäure, die sodann in mehrere Produkte, wie Stickstoff, Distickstoffoxyd, Kohlendioxyd und Ameisensäure zerfällt. In analoger Weise läßt sich auch das abnormale Verhalten gewisser Glycylpeptide erklären.

In analytischer Hinsicht erhob sich nun die Frage, wie man die sekundäre Stickstoffentwicklung ausschalten könne. Nach *van Slyke* gelangt man, falls nur Aminosäuren vorliegen, zu guten Ergebnissen, wenn man die Reaktion einfach nach 5 Minuten abbricht. Dies läßt sich jedoch nicht allgemein bei primären Aminen anwenden, da die Reaktionszeit sehr verschieden sein kann.

Wie sich zeigte, läßt sich die Sekundärreaktion weitgehend zurückdrängen, wenn man, nach einem Vorschlag von *Kendrick*[10], die *Desaminierung in Gegenwart von Jodid* vornimmt (vgl. [11,16]). Die mit Jodidzusatz gefundenen Werte liegen zwar noch immer etwas höher als berechnet (zirka 105% d. Th.), stellen jedoch bereits einen wesentlichen Fortschritt gegenüber denen ohne Jodidzusatz (zirka 140 bis 160%) dar. Auch beim Hitzeversuch war kein wesentlicher Zuwachs beobachtbar.

Wie weiter unten ausgeführt werden wird, hat sich der Jodidzusatz zur Desaminierungslösung, der von *Kendrick* speziell für gewisse Aminosäuren empfohlen wurde, auch allgemein zur Ausschaltung *aller* bei dieser Bestimmung auftretenden Anomalien bewährt. Die Wirkungsweise des zugesetzten Jodids wird derzeit noch untersucht. Es scheint möglich, daß das anwesende Jodid — wie bei der Zersetzung aromatischer Diazoniumverbindungen — als Substituent in das Molekül eintritt. Andere Versuche weisen darauf hin, daß Jodid die Konzentration an freier salpetriger Säure auf ein Minimum herabsetzt.

Cystin und Cystein: Nach *van Slyke* geben diese Aminosäuren bei 5 Minuten Reaktionsdauer 110% Stickstoff; *Schmidt*[8] fand, allerdings bei 45°, 111 bis 131% und *Kendrick*[10] bis zu 140%. Da in der Reaktionslösung Sulfat nachweisbar war, so nimmt *Lough*[17] als Ursache der Anomalie an, daß die Mercaptan-, bzw. Disulfidgruppe langsam oxydiert wird. Mit der neuen Apparatur konnte ich feststellen, daß die Reaktion sogar bis zu 180% ergeben kann. Führt man jedoch die Desaminierung in Gegenwart von Jodid aus, so wird die Anomalie weitgehend zurückgedrängt. Der Fehler betrug nach Erhitzen + 10%.

Serin: Nach *Schmidt*[8] ergibt Serin 105 bis 108% des berechneten Wertes. Von der Sekundärreaktion ist lediglich bekannt, daß bei der Desaminierung außer Glycerinsäure auch Formylessigsäure, bzw. Acet-

aldehyd entstehen (*Bettziehe*[18]). Setzt man jedoch zur Lösung Jodid zu, so tritt nur eine geringe zusätzliche Stickstoffentwicklung auf.

Zusammenfassung: Es konnte gezeigt werden, daß die primäre Aminogruppe in allen Aminosäuren und Peptiden bestimmt werden kann, wenn man die Reaktion nicht nur bei 20°, sondern auch bei 100° verfolgt. Die Desaminierung wird bei allen Verbindungen in Gegenwart von Jodid durchgeführt, wodurch die bisher bei gewissen Aminosäuren auftretende Anomalie, die ein zusätzliches Gasvolumen verursachte, weitgehend, jedoch nicht gänzlich*, zurückgedrängt wird.

Bestimmung der primären Aminogruppe in schwer löslichen Peptiden.

Mit dem vorliegenden Verfahren können ohne Schwierigkeit auch schwer lösliche Peptide analysiert werden, da die Einwaage — ohne vorherige Lösung — direkt in das Reaktionskölbchen einbringbar ist. Bisher war hierzu eine spezielle Zusatzapparatur[20] notwendig. Die zunächst nicht sichtlich löslichen Peptide gehen im Verlaufe des Desaminierungsvorganges entweder in Lösung, oder reagieren in heterogener Phase. Jedoch ist es vorteilhaft, wenn das Peptid möglichst feinkörnig vorliegt. Der entwickelte Stickstoff kann bei der neuen Apparatur unmittelbar am Azotometer abgelesen werden. Bezüglich der graphischen Auswertung vgl. *Doherty*[20]. Speziell bei synthetischen Polypeptiden wurde dieses Verfahren als Endgruppenbestimmung zur Ermittlung des „mittleren Molekulargewichtes" herangezogen.

Primäre Aminoalkohole.

Aminoalkohole reagieren zwar, wie zu erwarten, etwas langsamer als α-Aminosäuren, jedoch binnen 20 Minuten quantitativ. Der Hitzeversuch verursachte keine zusätzliche Stickstoffentwicklung. Anomalien wurden nicht beobachtet.

Primäre aliphatische Amine.

Aliphatische Amine reagieren durchwegs in der Kälte, doch kann die Zeit, die zur quantitativen Stickstoffentbindung benötigt wird, oft ein bis zwei Stunden betragen[4]. Durch kurzes Erhitzen (1 bis 2 Minuten auf 100°) läßt sich die Reaktionszeit auf 20 Minuten verkürzen. Primäre Aminogruppen, die sich in der Seitenkette eines aromatischen Ringes befinden (vgl. Benzylamin), verhalten sich wie aliphatische Aminogruppen. Bisher nahm man an, falls in der Kälte Stickstoffentwicklung auftrat,

* Aus diesem Grunde wird man bei Bestimmungen von geringen und geringsten Mengen Aminosäuren (z. B. im biologischen Material) statt dieser Bestimmung zweckmäßiger die α-Aminocarboxylgruppenbestimmung mit Ninhydrin (vgl. Übersicht bei *Wieland*[19]) heranziehen.

daß eine aliphatische Aminogruppe vorliege. Dies trifft wohl meistens, aber nicht immer zu: so können beispielsweise aromatische Aminogruppen, sowie Säureamidgruppen bereits in der Kälte quantitativ Stickstoff abspalten, wenn sie durch andere Substituenten aktiviert sind (z. B. *p*-Aminobenzolsulfonsäureamid).

Primäre aromatische Amine.

Befindet sich die primäre Aminogruppe an einem aromatischen Kern, so konnte sie bisher mit der *van Slyke*-Bestimmung nicht erfaßt werden; denn das intermediär auftretende Diazoniumsalz zerfällt erst in der Hitze. Wie sich zeigte, genügt kurzes Erhitzen auf 100°, um auch diese Gruppe quantitativ bestimmen zu können. Darüber hinaus ist es sogar in vielen Fällen möglich — insbesondere dann, wenn keine Säureamidgruppe oder sonstige langsam reagierende Aminogruppen vorliegen — durch Reaktion bei 20° und 100° qualitativ zwischen einem aliphatischen Amin und einem aromatischen Amin zu unterscheiden.

Carbonsäureamide.

Die primäre Aminogruppe in Carbonsäureamiden benötigt nach *van Slyke* zur quantitativen Reaktion bis zu 8 Stunden (bei 20°). Im allgemeinen hat man daher von einer Bestimmung abgesehen. Es zeigte sich nun, daß die Reaktion durch Erhitzen so beschleunigt werden kann, daß binnen 20 (längstens 40) Minuten quantitativ Stickstoff entwickelt wird.

Sulfonsäureamide.

Bei der Konstitutionsermittlung wie auch bei der Synthese von Sulfonamiden kann die Feststellung, ob eine primäre Aminogruppe vorhanden ist, sehr wertvoll sein. Da aber Sulfonsäureamidgruppen bei 20° mit salpetriger Säure nur sehr langsam reagieren, wurden sie bisher kaum auf diese Weise bestimmt. Durch Erhitzen läßt sich, wie ich experimentell nachgewiesen habe, auch diese Gruppierung quantitativ erfassen. Die gefundenen Werte lagen zunächst sogar um 10 bis 20% höher als berechnet*. Erst als die Desaminierung in Gegenwart von Jodid ausgeführt wurde, waren die Ergebnisse für die Sulfonamidgruppe exakt.

Anwendungsbereich des Verfahrens.

Für den Anwendungsbereich eines analytischen Verfahrens, insbesondere einer organischen Gruppenbestimmung, sind nicht nur die positiv ausfallenden Analysen, sondern auch die Ausnahmen und Ein-

* Zur Aufklärung dieser Anomalie sind noch Versuche im Gange. Interessant ist, daß die nach der Reaktionsgleichung zu erwartende Sulfonsäure keine sekundäre Gasentwicklung verursacht.

schränkungen entscheidend. Beim üblichen *van Slyke*-Verfahren zeigte sich, daß bei gewissen Verbindungen ein zusätzliches Gasvolumen auftritt: sofern dies bei primären Aminoverbindungen der Fall ist, wurde es oben erwähnt. Darüber hinaus liefern auch gewisse *stickstofffreie* Substanzen, bzw. Verbindungen *ohne* primäre Aminogruppe, ein oft nicht unbeträchtliches Gasvolumen. So fiel z. B. seinerzeit die Aminostickstoffbestimmung von Penicillin positiv aus, obwohl, wie sich später herausstellte, keine primäre Aminogruppe vorhanden ist. Ebenso lieferte Chrysogenin, das gelbe Begleitpigment des Penicillins, 2,7% „Stickstoff", obwohl es stickstofffrei ist (*Schenk*[21]).

Anomalien und deren Ausschaltung.

Um über das Ausmaß der bei der Aminostickstoffbestimmung möglichen Anomalien Kenntnis zu erlangen, habe ich solche Substanzen, bei denen eine Sekundärreaktion möglich schien, sowohl nach dem *van Slyke*-Verfahren, als auch nach dem neuen Verfahren untersucht.

Penicillin: Dieses gab nach dem neuen Verfahren (unter Jodidzusatz) bei 20° eindeutig keinen Stickstoff. Erst beim Hitzeversuch waren ganz geringe Mengen Stickstoff zu beobachten (der nach mehrmaligem Erhitzen gefundene Wert entspricht etwa 0.2 Aminogruppen). Hierbei besteht die Möglichkeit, daß die Schwefelgruppierung angegriffen wurde (*Schenk*[21]). Wahrscheinlicher ist, daß die bekanntlich gegen Hydrolyse sehr empfindliche Penicillinsäure (vgl. [22]) partiell unter Freilegung einer primären Aminogruppe aufgespalten wurde.

Partielle Hydrolyse unter Freilegung einer primären Aminogruppe.

Abgesehen von wenigen Ausnahmen, wie etwa Penicillin, ist eine Hydrolyse kaum zu befürchten, sofern die Desaminierungslösung mit Natriumacetat abgepuffert ist. Bei Peptiden tritt selbst in der Hitze keine Aufspaltung der Peptidbindung ein. In mineralsaurer Lösung hingegen ist nach *E. Fischer*[5] eine langsame Hydrolyse möglich (vgl. auch *Heyns*[23]). Die als leicht spaltbar geltenden Carbobenzoxylaminosäuren, die vielfach bei Peptidsynthesen verwendet werden, zeigen auch beim Hitzeversuch keine Anomalie.

Aufspaltung von Isonitrosoverbindungen.

Bekanntlich geben Oxime bei der *van Slyke*schen Reaktion etwas Stickstoff (vgl. [21]). Die Reaktion verläuft, wie ich feststellen konnte, bei 20° sehr langsam, wird jedoch durch Erhitzen beschleunigt. *Schenk*[21] hat hierfür ein Reaktionsschema angegeben. Eine andere Erklärung ist dadurch gegeben, daß Oxime unter Einwirkung von Säure und Nitrit langsam in Carbonylverbindung und Hydroxylamin aufgespalten werden. Letzteres scheint für die Gasentwicklung verantwortlich (vgl. [14]).

Jodidzusatz drängt auch hier die Sekundärreaktion soweit zurück, daß in der Kälte keine, in der Hitze nur eine geringe Gasentwicklung erfolgt. Es empfiehlt sich daher, bei Substanzen mit unbekannter Konstitution zusätzlich den Gesamtstickstoff (nach *Dumas*) zu bestimmen. Der Aminostickstoff muß in einem ganzzahligen Verhältnis zum Gesamtstickstoff stehen.

Intermediäre Bildung von Isonitrosoverbindungen.

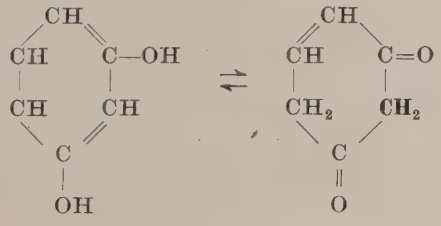
Überraschend wirkt die Tatsache, daß z. B. Malonsäure nach dem *van Slyke*-Verfahren 7% „Aminostickstoff" liefert. Resorcin gibt 13%, Formaldehyd 40% „Stickstoff". Ferner reagieren positiv nach dem *van Slyke*-Verfahren: 3-Dioxybenzole, 3-Dioxybenzoesäure, Ascorbinsäure, Acetessigester, Tetronsäure (vgl. [14]).

Analytisch war zunächst wichtig, ob sich diese Anomalien nach dem *neuen* Verfahren umgehen lassen. Es zeigte sich, daß bei Zusatz von Jodid in der Kälte kein „Stickstoff", beim Hitzeversuch hingegen, ähnlich wie bei Oximen, ein geringes Gasvolumen auftritt.

Betrachtet man obige Substanzen näher im Hinblick auf ihre Konstitution, so fällt auf, daß viele eine *aktivierte Methylengruppe* besitzen (vgl. auch [14]). Nun ist bekannt, daß Methylengruppen, die durch Carbonylgruppen aktiviert sind, mit salpetriger Säure sehr leicht eine Isonitrosoverbindung (Oxim) geben; z. B. reagiert Malonsäure wie folgt[24]:

Das entstandene Oxim wird, wie bereits angeführt, in der Desaminierungslösung mehr oder minder schnell unter Gasentwicklung zersetzt. Ebenso verhalten sich andere Substanzen mit aktivierter Methylengruppe, wie Campher, Barbitursäure, Tetronsäure, Acetessigester.

Ferner wird auch das anormale Verhalten von Resorcin verständlich: Resorcin bildet bekanntlich mit salpetriger Säure leicht eine Isonitrosoverbindung (vgl. [25]), die auf die tautomere Ketoform zurückzuführen ist. Auch Phloroglucin, dessen tautomere Form eine aktivierte Methylengruppe aufweist, zeigt diese Anomalie.



Schließlich sei noch auf die Anomalie gewisser Phenole hingewiesen, die zwar keine aktive Methylengruppe besitzen, aber mit salpetriger Säure eine *p*-Nitrosoverbindung bilden. Diese ist tautomer mit der entsprechenden Isonitrosoverbindung, welche sodann die Sekundärreaktion auslöst (z. B. *p*-Nitrosophenol $\rightleftharpoons$ *p*-Chinonoxim).

Untersucht man rückblickend die eingangs bei Glycin und Glycylpeptiden beobachtete Anomalie, so findet man, daß auch in diesem Falle eine *aktivierte Methylengruppe* die Ursache der Sekundärreaktion ist. Durch Nebenreaktion entsteht aus Glycin Nitroessigsäure[13], die sich leicht nitrosieren läßt. Die gebildete Isonitrosoverbindung zerfällt dann nach dem von *Austin* angegebenen Schema.

Auch die bisher ungeklärten Anomalien bei Serin und Tryptophan sind auf diese Weise verständlich. Bei der Desaminierung von Serin entsteht sekundär Formylessigsäure (*Bettziehe*[18]), die eine aktive, leicht nitrosierbare Methylengruppe besitzt. Analog verhalten sich Tryptophan und Pyrrolderivate, da auch der Pyrrolring in seiner tautomeren Form eine aktive Methylengruppe aufweist, die nitrosierbar ist (vgl. [26]). Bei deren Zerfall erfolgt sekundäre Gasentwicklung.

Ketimid-Enamin-Tautomerie.

Diese Tautomerie tritt praktisch nur selten auf. Die hierbei durch Umlagerung entstehende primäre Aminogruppe reagiert in der Kälte kaum, in der Hitze jedoch quantitativ. Durch Jodidzusatz wird die Umlagerung stark gehemmt; die entwickelte Gasmenge ist sehr gering.

Somit lassen sich alle erwähnten Anomalien, die bisher bei der *van Slyke*-Bestimmung beobachtet wurden, durch *Zusatz von Jodid* zur Desaminierungslösung soweit zurückdrängen, daß in der Kälte keine, in der Hitze nur eine geringe Gasentwicklung auftritt. Durch Gegenüberstellung der Analysenwerte für Aminostickstoff und für Gesamtstickstoff kann man in Zweifelsfällen Fehlschlüsse vermeiden.

Für wertvolle Hinweise und Überlassung von Testsubstanzen danke ich dem Vorstand des Institutes, Herrn Prof. Dr. *F. Wessely* und insbesondere auch Herrn Dr. *K. Schlögl*; ferner danke ich Herrn Prof. Dr. *H. Bretschneider* (Pharm. Chem. Institut, Innsbruck) für Sulfonamide, Herrn Doz. Dr. *R. Brunner* (Biochemie GmbH., Kundl, Tirol) für Penicillin und den Herren Dr. *M. Pöhm* (Firma A. v. Waldheim, Wien) und Dr. *O. Vogl* (II. Chem. Institut) für Aminoalkohole.

Experimenteller Teil.

Apparatives.

Die in Abb. 1 dargestellte Apparatur* besteht aus:

Kohlendioxydentwickler: Es wurde die übliche Ausführung (Dewar-Gefäß mit Quecksilber-Überdruckventil) verwendet.

Reaktionseprouvette (1); Als solche dient ein abnehmbares Röhrchen von zirka 7 ml Inhalt, welches mittels eines *Schliffes* (2) an die Apparatur angeschlossen wird. In die Reaktionseprouvette führt ein *Gaseinleitungsrohr* (3), das zirka 0,5 cm oberhalb des Eprouvettenbodens endet. An den Schliff (2) ist ein *Patenthahn* (4) angeschmolzen [Stellung 1: in die Apparatur strömt Kohlendioxyd ein, dessen Strömungsgeschwindigkeit mit einer Feineinstellritze reguliert wird. Stellung 2: aus dem darüber angebrachten *Trichter* (5) fließt Nitritlösung zu, falls gleichzeitig auch der *Absperrhahn* (6) geöffnet wird].

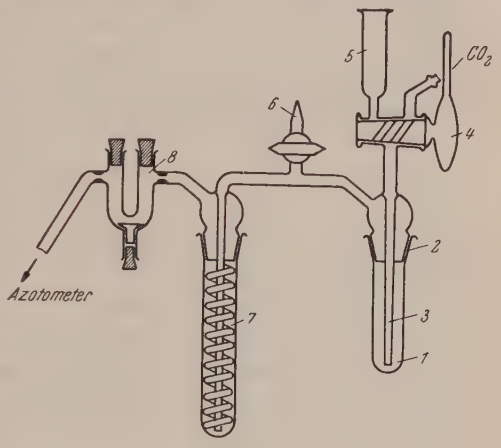


Abb. 1.

Der *Wäscher* (7) besteht aus einer abnehmbaren Eprouvette von zirka 10 ml Inhalt. Zur besseren Waschwirkung ist eine Glasspirale eingebracht. An den Wäscher ist ein *U-Rohr* (8), angeschmolzen das mit Glasperlen beschickt ist und oben mit zwei Gummistopfen verschlossen wird. Unten befindet sich — zur Reinigung des U-Rohres — ein Ansatz für die Vakuumpumpe. Ein in den Ansatz eingebrachter, plattgedrückter Glasstab verhindert, daß Glasperlen herausfallen.

Azotometer: Ausführung nach *Pregl* oder *Müller*[27].

Zur Beschickung der Apparatur.

Desaminierungslösung: Während man früher[5] die salpetrige Säure mittels Mineralsäure aus dem Nitrit in Freiheit setzte, hat *van Slyke* zur Vermeidung von Nebenreaktionen Essigsäure verwendet. Der Umsatz Essigsäure/Nitrit verläuft unter sehr lebhafter Stickstoffoxydentwicklung, da die entstehende salpetrige Säure sofort zerfällt. Da es für die vorliegende Bestimmung notwendig war, auch in der Hitze genügend Nitrit zur Verfügung zu haben, habe ich die Essigsäure mit Natriumacetat gepuffert. Der dabei beobachtete Blindwert ist äußerst gering.

Absorptionslösung für Stickstoffoxyd: In der neuen Apparatur ist — durch die Verwendung von Kohlendioxyd als Spülgas bedingt — an Stelle der bisherigen Hempelpipette ein Wäscher vorgesehen. Die Wahl eines geeigneten Absorptionsmittels war nicht leicht, da dieses wesentlich wirksamer sein muß als bei einer Hempelpipette (vgl. *Moser*[28]). Zunächst erprobte ich

* Der Firma *P. Haack*, Wien, danke ich für die gute Zusammenarbeit bei der Entwicklung der Apparatur.

Kaliumpermanganat. Dieses absorbiert wohl in schwach saurer Lösung Stickstoffoxyd, doch verstopfte das ausfallende Mangandioxyd bald das Einleitungsrohr des Wäschers. Eine stärker angesäuerte Lösung (etwa 2-n an Schwefelsäure) zeigte hingegen bereits eine merkliche Gasentwicklung, die auf eine Zersetzung (Sauerstoffabspaltung) zurückzuführen ist (vgl. *Skrabal*[29]). Somit konnte Kaliumpermanganat nicht verwendet werden. *Chromsäure* (in schwefelsaurer Lösung) reagierte zu langsam und war daher unbrauchbar. Ausgezeichnet hingegen bewährte sich *Bromsäure* (in schwefelsaurer Lösung); vgl. auch *Klemenc*[30]. Selbst bei starker Stickstoffoxydentwicklung wurden damit im Azotometer einwandfreie Mikroblasen erhalten. Die Bromatlösung wird hierbei unter Bromauscheidung reduziert. Gelangt aber Brom in das Azotometer, so bildet sich Quecksilberbromid, das in Form einer zusammenhängenden Schicht den Austritt der Mikroblasen behindert. Zur Absorption des Broms ist daher an den Wäscher ein U-Rohr angeschmolzen, dessen Glasperlen mit Natriumthiosulfat benetzt sind.

Reagenzien.

Eisessig-Natriumacetat: Eine gesättigte wäßrige Lösung von Natriumacetat (zirka 40 g ad 100 ml) wird mit Eisessig im Verhältnis 1:1 vermischt; 2-ml-Pipette.

Natriumnitrit: Gesättigte wäßrige Lösung (30 g ad 100 ml); Meßpipette.

Kaliumjodid: 10%ige wäßrige Lösung; 2-ml-Pipette.

Bromat-Schwefelsäure: Eine gesättigte wäßrige Lösung von Kaliumbromat (1 g Salz in 15 ml) wird jeweils vor einer Analysenserie mit Schwefelsäure (1:1) im Verhältnis 1:1 vermischt. Diese Absorptionslösung wird nach 3 Analysen erneuert.

Natriumthiosulfat: Gesättigte wäßrige Lösung (für U-Rohr); Tropfpipette.

Azotometerlauge: Hergestellt in üblicher Weise.

Ausführung der Bestimmung.

Vorbereitung der Apparatur: Zunächst wird der Wäscher mit Bromat-Schwefelsäure gefüllt und an die Apparatur angeschlossen. In das U-Rohr bringt man — unter schwachem Saugen an der untersten Stelle — soviel Natriumthiosulfatlösung, daß die Perlen benetzt sind (ausreichend für zwei bis drei Bestimmungen). Das Azotometer wird mit Lauge gefüllt.

Einwaage: Im allgemeinen werden zirka 2 bis 3 mg Substanz in einem Wägeröhrchen eingewogen und in die Reaktionseprouvette (1) geschüttet. Bei Substanzen mit sehr geringem Aminostickstoffgehalt, wie synthetischen Polypeptiden, wird soviel eingewogen, daß das abgelesene Volumen zwischen 0,2 und 0,6 ml liegt. Für Flüssigkeiten verwendet man Glasnäpfchen, für leichtflüchtige Öle dünnwandige Kapillaren, die nachher in der Reaktionseprouvette zerdrückt werden (Glasstab mit Eisessig abspülen). Sodann setzt man 2 ml Eisessig-Natriumacetatlösung und 2 ml Jodidlösung zu und schließt die Eprouvette an die Apparatur an. Der Trichter (5) wird mit 1,5 ml Nitritlösung beschickt.

Entlüftung der Apparatur: Um die Luft zu entfernen, wird zunächst in schnellem Tempo Kohlendioxyd durchgeleitet. Das Spülgas läßt man beim zweiten Gummistopfen des U-Rohres austreten. Dadurch wird einerseits die Azotometerlauge geschont, anderseits — bei vorangegangener Analyse — das aus der Absorptionsflüssigkeit entweichende Brom im U-Rohr zurückgehalten. Im allgemeinen genügt eine Spülzeit von 5 Minuten (Kontrolle im Azotometer: Mikroblasen). Sodann erzeugt man in der Apparatur einen geringen Überdruck, indem man die Azotometerbirne hebt und in den oberen Haltering des Azotometers einhängt. Stellt man den Patenthahn (4) in Richtung Nitritlösung, so entweicht — durch den Überdruck — etwas Kohlendioxyd und entfernt die in der Hahnbohrung befindliche Luft; sonst müßte die Hahnbohrung vorher mit Wasser gefüllt werden.

Nitrosierung: Damit die Nitritlösung in das Reaktionsgefäß einfließen kann, muß noch der Entlüftungshahn (6) geöffnet werden. Nachdem zirka 1 ml Lösung zugeflossen ist, schließt man sofort Hahn (6) und Patenthahn (4). Im Reaktionsgefäß tritt eine sehr lebhafte Stickstoffoxydentwicklung ein. Sobald diese nachgelassen hat, senkt man die Azotometerbirne und leitet Kohlendioxyd im Tempo von etwa 5 bis 10 Blasen pro 10 Sekunden durch die Apparatur. Nach zirka einer Minute treten im Azotometer bereits Stickstoffblasen auf. Im allgemeinen muß man etwa 20 Minuten Kohlendioxyd durchleiten, um wieder Mikroblasen zu erhalten. Der abgelesene Wert wird als „Kaltwert" bezeichnet. Das Azotometer wird sodann auf Marke Null gestellt.

Hitzeversuch: Falls nach 20 Minuten keine Mikroblasen auftreten, wird ein Hitzeversuch gemacht. In vielen Fällen kann man — schon zwecks Zeitersparnis — gleich von vornherein mit einem Hitzeversuch beginnen. Hierzu taucht man das Reaktionsgefäß zirka 1 bis 2 Minuten in kochendes Wasser. Liegen Säureamide oder aromatische Amine vor, so setzt sofort eine stärkere Stickstoffentwicklung ein, die meist nach 15 bis 20 Minuten abgeschlossen ist. Wurde die Hauptmenge Stickstoff bereits in der Kälte entbunden, so zeigen gegebenenfalls beim Hitzeversuch auftretende kleine Stickstoffblasen an, daß die Reaktion bei 20° noch nicht beendet war. Zur Kontrolle kann noch ein zweites Mal erhitzt werden, doch genügt im allgemeinen einmaliges Erhitzen. Der abgelesene Wert wird als „Heißwert" bezeichnet.

Anmerkung: Obwohl man eine anomale Stickstoffentwicklung durch Jodidzusatz zur Desaminierungslösung meist weitgehend, oft sogar gänzlich ausschalten kann, scheint es doch wichtig, bei jeder Substanz feststellen zu können, ob sie zur Gruppe der Anomalien gehört. Hierzu wird ein Versuch mit und einer ohne Jodid durchgeführt. Erhält man ohne Jodidzusatz ein wesentlich höheres Ergebnis als mit Jodid, so

liegt eine Anomalie vor und eine Gegenüberstellung zum Dumaswert scheint geboten.

Berechnung: Vom gefundenen Volumen ist der Blindwert der Nitritlösung, sowie 2% Volumkorrektur (nach *Pregl*) abzuziehen. Das meist zur Verfügung stehende Natriumnitrit von Merck ist sehr rein. Ein geringer Blindwert (zirka 0,03 bis 0,04 ml) ist nicht so sehr auf das Nitrit, sondern auf die in der Nitritlösung enthaltene Luft zurückzuführen. Auch beim Hitzeversuch ergibt sich ein geringer Blindwert, den man pro Ansatz Nitritlösung bestimmt.

Beleganalysen.

Substanz	% Stickstoff			Prim. Aminogruppen
	Gefunden		Berechnet	
	Kaltwert	Heißwert		
Histidin	9,03	0	9,02	1,00
Oxyprolin	0	0	0	0
Phenylalanin	8,39	0	8,48	0,99
Alanin	15,88	0	15,73	1,01
Asparaginsäure	10,55	0	10,53	1,00
Methionin	9,36	0	9,40	1,00
Leucin	10,42	0	10,68	0,97
Valin	11,93	0	11,95	1,00
Tyrosin	7,98	0	7,74	1,03
Aminobuttersäure	13,65	0	13,58	1,00
Glycin	18,91	0	18,65	1,02
γ-Aminobuttersäure	—	13,45	13,58	0,99
α-Aminoglutarsäure-Hydrochlorid	7,50	0	7,63	0,99
α-Aminocapronsäure	10,53	0	10,68	0,99
Alanylglycin	9,76	0	9,58	1,01
Leucylglycylglycin	5,69	0	5,71	1,00
Alanylleucylglycin	5,22	0	5,40	0,97
Valylglycylglycin	5,86	0	6,06	0,97
α-Aminobutyrylglycylglycin	6,27	0	6,45	0,97
Tripeptid des Phenylalanins	2,90	0	2,93	1,00
Glycyltyrosin	6,16	0	5,88	1,05
Poly-O-acetyltyrosin	—	0,398	0,40	Polymerisationsgrad: 18
Harnstoff	—	46,61	46,66	2,00
Arginin	6,57	6,37	13,35	1,97
Methioniol, neutrales Oxalat	7,64	0	7,77	0,98
Isoleucinol, neutrales Oxalat	8,69	0	8,64	1,00
2-Aminohexanol (1), saures Oxalat	6,97	0	6,76	1,03
p-Methylbenzolsulfonsäureamid	—	8,19	8,20	1,00
Aminobenzylsulfonsäureamid	7,78	7,58	15,06	2,02

Zusammenfassung.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Einwirkung von salpetriger Säure auf primäre Amine im Hinblick auf eine quantitative Bestimmung untersucht. Es wurde gefunden, daß sich mit Hilfe dieser Reaktion *alle* primären Aminogruppen, gleich welcher Bindung, also auch Carbonsäureamide, Sulfonsäureamide und aromatische Amine quantitativ bestimmen lassen, wenn man die Reaktion nicht nur wie bisher in der Kälte, sondern auch in der Hitze (Heißwert) verfolgt. Sekundärreaktionen beim Hitzeversuch wurden nicht beobachtet. Durch Erhitzen ließ sich die Reaktionszeit, die bisher sehr verschieden war und bis zu acht Stunden betragen konnte, einheitlich auf 20 bzw. längstens 40 Minuten reduzieren. Zu diesem Zwecke wurde eine einfache Apparatur entwickelt, mit deren Hilfe der Verlauf der Desaminierung unmittelbar im Azotometer zu verfolgen ist. Mit Erfolg wurden auch schwer lösliche Peptide untersucht.

Im besonderen wird sodann auf die Anomalien eingegangen, die bei der bisherigen *van Slyke*-Bestimmung eine zusätzliche Gasentwicklung verursacht haben. Es wird darauf hingewiesen, daß sehr viele Anomalien entweder auf eine primär vorhandene Isonitrosogruppe oder auf eine intermediär (aus aktiven Methylengruppen) entstehende Isonitrosoverbindung zurückzuführen sind. Damit scheint auch die Anomalie bei Glycin, Serin und Tryptophan sowie bei allen Substanzen mit aktiver Methylengruppe geklärt. Analytisch wichtig ist, daß sich alle Anomalien, die bisher beobachtet wurden, durch Zusatz von Jodid zur Desaminierungslösung weitgehend ausschalten lassen.

Summary.

The present study deals with the action of nitrous acid on primary amines with respect to a quantitative determination. It was found that with the aid of this reaction *all* primary amino groups, no matter how they are bound, and hence also amides of carboxylic acids, sulfonic acids and aromatic amines, can be determined quantitatively if the reaction is carried out not only in the cold, as has been the practice, but also at higher temperature (hot value). No secondary reactions were observed in the reactions conducted in the warm. By heating the reaction time was reduced to 20–40 minutes in all cases, whereas in the cold, this period was quite variable and sometimes was as long as 8 hours. A simple apparatus was developed for this particular purpose; with its aid the course of the determination can be followed directly in the azotometer. Difficultly soluble peptides were likewise studied successfully.

Special attention was given to anomalies, which have given rise to a supplementary evolution of gas in the previous *van Slyke* determination. It was pointed out that many anomalies can be attributed to either the presence of a primary isonitroso group or to an intermediary isonitroso compound (arising from active methylene groups). Hence the anomalies in the cases of glycine, serine and tryptophane, as well as materials with

active methylene groups, seems to be explained. From the analytical standpoint, it is important that all the anomalies observed thus far can be averted to a considerable extent by adding iodide to the deaminating solution.

Résumé.

Dans le présent travail on a étudié l'action de l'acide nitreux sur les amines primaires en vue d'un dosage quantitatif. On a trouvé que, au moyen de cette réaction *tous* les groupements aminés primaires quel que soit leur mode de liaison aussi bien sur des amides carboxyliques, des sulfonamides et des amines aromatiques peuvent se déterminer quantitativement quand on l'effectue non seulement à froid comme on le faisait jusqu'ici, mais aussi à chaud (valeur à chaud). On n'a pas observé de réactions secondaires dans l'essai à chaud. En chauffant, la durée de la réaction qui était jusqu'ici très variable et pouvait aller jusqu'à 8 heures est réduite uniformément à 20 minutes, tout au plus à 40 minutes. Dans ce but, on a mis au point un dispositif simple avec lequel la marche de la désamination est suivie immédiatement à l'azotomètre. On a aussi expérimenté avec succès des peptides peu solubles.

En particulier, on a éliminé les anomalies qui produisaient un surplus de gaz au cours du dosage par la méthode de *van Slyke*. On a montré par suite que de très nombreuses anomalies soit avec un groupe isonitroso primaire existant, soit avec un composé isonitrosé apparu intermédiairement (à partir de groupes méthyléniques actifs) peuvent se réduire. Par suite, l'anomalie avec le glycocolle, la sérine, le tryptophane, de même qu'avec toutes les substances à groupements méthyléniques actifs est éclaircie. Analytiquement il est important que toutes les anomalies qui étaient observées jusqu'alors, par addition d'iodure à la solution desaminante soient considérablement éliminées.

Literatur.

[1] *H. Meyer*, Analyse und Konstitutionsermittlung organischer Verbindungen, 5. Aufl., S. 521ff. Berlin: Springer-Verlag. 1931.

[2] *D. D. van Slyke*, J. Biol. Chem. **9**, 185 (1911); **12**, 275 (1912); **16**, 121 (1913); **23**, 407 (1915); s. auch *E. Abderhalden*, Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden. Abt. I, Teil 7, S. 263. Wien: Urban und Schwarzenberg. 1925; J. Biol. Chem. **83**, 425 (1929).

[3] *J. Klein*, J. Biol. Chem. **10**, 287 (1911); *E. Kuppelwieser* und *K. Singer*, Biochem. Z. **178**, 325 (1926); *F. C. Koch*, J. Biol. Chem. **84**, 601 (1929); *S. J. Foley*, Biochem. J. **24**, 961 (1930); *J. C. Harral*, Analyst **56**, 527 (1931); *H. Wenderoth*, Chem. Ing. Techn. **21**, 229 (1949); *W. Otting*, Chem. Ing. Techn. **24**, 452 (1952).

[4] *F. Pregl*, Quantitative organische Mikroanalyse, neubearbeitet von *H. Roth*, 6. Aufl. S. 210. Wien: Springer-Verlag. 1949.

[5] *E. Fischer* und *W. Koelker*, Ann. Chem. **340**, 177 (1905); vgl. auch *H. Meyer*, l. c. S. 521.

[6] *A. S. Hussey* und *J. E. Maurer*, Analyt. Chemistry **24**, 1642 (1952).

[7] *E. Abderhalden* und *D. D. van Slyke*, Z. physiol. Chem. **74**, 505 (1911).

[8] *C. L. A. Schmidt*, J. Biol. Chem. **82**, 587 (1929).

[9] *O. Gerngroß* und *W. Deseke*, Ber. dtsch. chem. Ges. **66**, 1813 (1933).

[10] *A. B. Kendrick* und *M. E. Hanke*, J. Biol. Chem. **117**, 161 (1937); **132**, 739 (1940).

[11] *M. S. Dunn* und *J. Porush*, J. Biol. Chem. **127**, 261 (1939).

[12] *M. Viskontini*, Helv. Chim. Acta **29**, 1491 (1946).
[13] *A. T. Austin*, J. Chem. Soc. London **1950**, 149.
[14] *M. A. Abdel-Akher* und *W. M. Sandström*, Arch. Biochemistry **30**, 407 (1951).
[15] *W. Hückel*, Theoretische Grundlagen der organischen Chemie, 1. Band, 4. Aufl. S. 345. Leipzig: Akademische Verlagsgesellschaft Becker und Erler K. G. 1943.
[16] *L. A. Sluyterman* und *M. Kooistra*, Rec. trav. chim. Pays-Bas **70**, 1045 (1951).
[17] *S. A. Lough* und *H. B. Lewis*, J. Biol. Chem. **104**, 601 (1934).
[18] *F. Bettziehe*, Z. physiol. Chem. **150**, 180, 186 (1925).
[19] *Th. Wieland*, Fortschr. chem. Forsch. **1**, 252 (1950).
[20] *D. G. Doherty* und *C. L. Ogg*, Ind. Eng. Chem., Analyt. Ed. **15**, 751 (1943); daselbst auch weitere Literaturangaben; s. auch *O. Klemm* und *K. H. Meyer*, Helv. Chim. Acta **23**, 1444 (1940).
[21] *M. Schenk*, Z. physiol. Chem. **282**, 88 (1947).
[22] *E. P. Abraham, E. Chain, W. Baker* und *R. Robinson*, Nature **151**, 107 (1943).
[23] *K. Heyns* und *F. Woyrsch*, Chem. Ber. **86**, 76 (1953).
[24] *M. Conrad* und *C. A. Bischoff*, Ann. Chem. **209**, 211 (1881).
[25] *F. Henrich*, Ber. dtsch. chem. Ges. **35**, 4191 (1903).
[26] *M. Spica* und *F. Angelico*, Gazz. chim. ital. **29**, II, 58 (1899).
[27] *A. Müller*, Mikrochem. **33**, 192 (1948).
[28] *L. Moser*, Z. analyt. Chem. **50**, 401 (1911).
[29] *A. Skrabal* und *J. Preiß*, Mh. Chem. **27**, 535 (1906).
[30] *A. Klemenc* und *C. Bunzel*, Z. anorg. Chem. **122**, 315 (1922).

Aus dem Pharmakognostischen Institut der Universität Graz.

Zum Nachweis von Analgeticis und Alkaloiden mittels Tetraphenylbornatrium (Kalignost) und Nitrokörpern.

Von

R. Fischer und **M. S. Karawia.**

(Eingelangt am 13. Juli 1953.)

Zur Identifizierung von Alkaloiden und besonders von Analgeticis liegt bereits eine Anzahl von Arbeiten vor. Davon seien nur einige neuere Mitteilungen genannt: *Kofler* und *Müller*[1], *Kofler* und *Lennartz*[2], *L.* und *A. Kofler*[3], *Griebel*[4], *Opfer-Schaum*[5], *Wegner*[6], *Vidic*[7], *Brandstätter*[8], *Breinlich*[9]. Im allgemeinen unterscheidet man drei Verfahren der Identifizierung: 1. die Herstellung kristallisierter Fällungen oder die Anwendung von Farbreaktionen ohne genauere (detaillierte) Kennzeichnung; 2. die Bestimmung von Schmelzpunkten der mit Fällungsreagenzien erhaltenen Addukte; 3. die Bestimmung des Schmelzpunktes der Reinsubstanz (Alkaloidsalz) und deren Kennzeichnung durch Eutektika und gegebenenfalls durch den Brechungsindex der Schmelze.

In den vorliegenden Arbeiten wurde jeweils nur ein Teil der gebräuchlichen Analgetika berücksichtigt und — bis auf das Verfahren von *Kofler*[3] und *Brandstätter*[8] — die Identifizierung nicht immer mit allen zur Verfügung stehenden Mitteln durchgeführt. Auf die Unsicherheit der Erkennung von Substanzen und Fällungen an ihrer Kristallform allein wurde bereits vor 20 Jahren von uns öfter hingewiesen (*Kofler*[10], *Fischer* und *Moor*[11], *Fischer* und *Paulus*[12]) und betont, daß die erhaltenen Kristalle ihrerseits wieder durch Schmelzpunkt, Eutektika und Brechungsindex der Schmelze gekennzeichnet werden müssen.

Wir haben deshalb die nötigen Daten für die Erkennung von 13 Analgeticis durch die Herstellung kristallisierter Derivate und durch die Bestimmung von deren Schmelzpunkten und eutektischen Temperaturen festgestellt. Als neues Fällungsreagens wurde — neben den schon bekannten Nitrokörpern — das Kalignost (Tetraphenylbornatrium) verwendet. Auf die Ausmittlungs- und Reinigungsverfahren soll hierbei

nicht eingegangen werden. Erwähnt sei in diesem Zusammenhang die Mitteilung von *Fischer* und *Chalupa*[13] und besonders die verdienstvollen Arbeiten von *Breinlich*[9] und *Vidic*[7]. Unsere Untersuchungen zerfallen in drei Teile:

1. Umsetzung von 13 Analgeticis und 17 Alkaloiden mittels Kalignost, Bestimmung des Schmelzpunktes der Fällung und der Eutektika mit zwei bis drei Testsubstanzen.

2. Umsetzung der Analgetica mit drei Nitrokörpern: Pikrolonsäure, Styphninsäure und Trinitrophloroglucin, wobei die Addukte mit ersterer durch die Eutektika mit zwei *Kofler*schen Testsubstanzen, die der beiden letzteren durch das Eutektikum mit dem Reagens selbst identifiziert werden.

3. Spaltung der Addukte von Analgeticis mit Nitrokörpern in einer Aluminiumoxyd-Säule (*Hesse*[14]) und Gewinnung der Reinsubstanz aus dem Eluat. Dieses Verfahren ist bei der Isolierung aus biologischem Material von Bedeutung (*Fischer* und *Chalupa*[13]).

1. Versuche mit Kalignost.

Kalignost bildet mit Kaliumsalzen schwer lösliche Niederschläge und wird zu deren gravimetrischer Bestimmung mit Erfolg verwendet (*Wittig*[15], *Raff* und *Brotz*[16]). Über eine gravimetrische Mikrobestimmung des Kaliums berichtet *Flaschka*[17], über eine mikrotitrimetrische *Flaschka*, *Holasek* und *Amin*[18], über eine titrimetrische Bestimmung von Arzneimitteln mit Kalignost im Mikromaßstab *Flaschka*, *Holasek* und *Amin*[19]. *Schultz* und *Mayer*[20] benützen die Schwerlöslichkeit der Fällungen mit stickstoffhaltigen organischen Verbindungen für die quantitative Bestimmung. Wir beobachteten nun, daß diese Fällungen meist schmelzbar sind und sich zur Identifizierung eignen.

Methodik: Kalignost wird in 3%iger wäßriger, wenn möglich frisch bereiteter, völlig klarer Lösung verwendet. Bei längerem Stehen trübt sie sich infolge Zersetzung. Durch sorgfältige Filtration kann sie wieder verwendbar gemacht werden. Die Alkaloidlösung verwendet man etwa 0,1%ig, hergestellt durch Lösen des Salzes in Wasser oder der Base in Essigsäure; den p_H-Wert hält man bei etwa 3 bis 4, denn in alkalischem Medium tritt meist keine Fällung ein. Sollte der Niederschlag nicht gut kristallisiert sein, so versetzt man entweder mit Aceton bis zur Wiederauflösung und läßt das Aceton an der Luft zum Teil abdunsten, wobei sich meist schöne Kristalle bilden. Oder man erhitzt auf 70° (nicht höher), wobei sich die Fällung löst, und läßt langsam abkühlen. Reiben mit einem Glasstab befördert die Kristallisation. Man wäscht sorgfältig, um das nicht schmelzbare, verkohlende Reagens zu entfernen. Hierauf werden nach kurzem Trocknen der Mikro-Schmelzpunkt und die Eutektika nach *Kofler*[3]

bestimmt. Der Vollständigkeit halber sind in der Tabelle 2 (erste Kolonne) auch die Mikroschmelzpunkte von Salzen dieser Basen angegeben. Diese Schmelzpunkte sind infolge von Zersetzungsvorgängen oft unscharf und wechseln von Präparat zu Präparat. Außerdem sind häufig verschiedene Modifikationen anzutreffen (*Brandstätter*[8]).

Für die meisten dieser Salze geben *Kofler* und *Brandstätter*[8] auch die eutektischen Temperaturen an. Soweit dies nicht der Fall ist, sind diese Werte der folgenden Tabelle zu entnehmen:

Tabelle 1. Eutektische Temperaturen.

	Benzil	Acetanilid	Benzanilid	Salophen	Dicyandiamid
Dromoran-HCl	94°	91°			
Permonid-HCl				181°	169°
Ticarda-HCl			105°	120—121°	

Aus Tabelle 2 ersieht man, daß die scharfen Schmelzpunkte der Tetraphenylborate von Morphinderivaten meist über 150°, die der übrigen Analgetika darunter liegen. Die Basen letzterer sind mit Ausnahme von Cliradon flüssig. Bis auf Polamidon und Heptalgin geben alle Analgetika mit Kalignost kristallisierte Verbindungen, ebenso die angeführten Alkaloide mit Ausnahme von Emetin, Eserin, Pilocarpin, Papaverin und Aconitin. Letztere Fällung schmilzt recht scharf und ermöglicht mit ihren eutektischen Temperaturen eine gute Kennzeichnung. Infolge der Ähnlichkeit mancher Substanzen liegen bei diesen auch die Schmelzpunkte und Eutektika der Tetraphenylborate einander ziemlich nahe, wenn auch die Reproduzierbarkeit der Schmelzpunkte recht gut ist. Dies gilt für die Substanzpaare Dromoran und Morphin, Dicodid und Eucodal sowie Eucodal und Dionin. Bei diesen drei Paaren ergeben die Addukte mit Nitrokörpern günstigere Resultate.

Zum Ticarda sei erwähnt, daß hierbei lediglich die hustenwirksame Komponente Diphenyldimethylamidohexanon, die wohl nicht als Analgeticum anzusprechen ist, geprüft wurde, und zwar nur mit Rücksicht auf ihre Ähnlichkeit mit Polamidon.

Das Eutektikum zwischen Scopolamin-Hydrobromid und Pilocarpin-Hydrochlorid wurde mit 172° gefunden.

2. Kennzeichnung mit Hilfe von Nitrokörpern.

Von den Nitrokörpern erwiesen sich Pikrolonsäure, Styphninsäure und Trinitrophloroglucin als die geeignetsten. Die Fällung (auf dem Objektträger oder in der Proberöhre) und das Waschen und Trocknen erfolgte in der üblichen Weise (*Kofler* und *Müller*[1]). Bei den Pikrolonaten wurden die von *Kofler*[3] empfohlenen Testsubstanzen zur Bestimmung der eutek-

Tabelle 2. Tetraphenylborate.

Schmelzpunkt des Salzes		Analgeticum bzw. Alkaloid	Kristallform	Fp. °C	eutekt. Temp. mit Acetanilid	eutekt. Temp. mit Phenacetin	eutekt. Temp. mit Salophen
285—300*		Morphin	regelmäßige Prismen	169—174	102	122	155
200– 216	(180— 235*)	Heroin	kleine Prismen	161—163	107	126	146
295— 307		Permonid	feine kurze Nadeln	158—160	93	113	148
145—150	(149—156*)	Dionin	kleine Prismen	157	108	125	152—153
115—118		Dromoran	feine Prismen und Nadeln	173—175	101	118	149
250—260	(235– 260*)	Eucodal	feinkristallines Pulver	155	104	123	147
163—173	(175 185*)	Dicodid	kleine körnige Kristalle	150	100	123	147
230—233		Acedicon	Nadeln und Prismen	170	104	124	152
186—188	(188—191**)	Dolantin	kleine Prismen und Spieße	139– 140	81	109	133
193—200	(200—206**)	Hö 10720 Cliradon	kleine Prismen und Schuppen	150– 151	84	105	137
228—232**		Polamidon Algolysin	feine Körner	86	62	78	
185—200	(198—208**)	Hö 10600 Heptalgin	feine Körner	91—93	69	82	
171—173,5		Ticarda	kurze Nadeln	144	102	121	139
141—143		Prostigmin sulf.	Prismen und kleine Nadeln	215—216	111	130	174
280—310	(260—305*)	Strychnin nitr.	feinkristallines Pulver	171—175	109	125	157
283—290*		Tropacocain-HCl	Prismen	156—157	103	122	148
181—183		Eucatropin-HCl	Nadeln und Spieße	155—156	90	108	140
156*		Novocain-HCl	feinkristallines Pulver	147—151	97	115	143
170—178*		Brucin Base	kristalline Schuppen u. kl. Prismen	144—145	94	113	
190—193*		Atropin sulf.	Schuppen und kleine Prismen	140	100	116	
104—107*		Hyoscyamin Base	Schuppen und Prismen	137—139	98	118	
187—188		Aconitin nitr.	amorphes Pulver	135	72	94	
205—215*		Emetin-HCl	amorphes Pulver	114—115	70	91	
179*		Physostigmin salicyl.	amorphes Pulver	106	68	85	
181—184*		Euphtalmin HCl	feinkristallines Pulver	94	57	77	
189—191*		Cocain HCl	amorphes Pulver	96—98	70	82	
190—197*		Scopolamin HBr	feinkristallines Pulver	102—103	67	87	
200*		Pilocarpin HCl	amorphes Pulver	81—82	65	80	
215—220		Papaverin-HCl	amorphes Pulver	100—102	63	79	
220		Ephedrin-HCl	kleinste Kristalle	80—83	50	68—69	

* *L.* und *A. Kofler*[3]. ** *M. Brandstätter*[8].

tischen Temperatur verwendet, da sich hier das von *Opfer-Schaum*[21] empfohlene Eutektikum zwischen Fällung und Reagens nicht bewährt hat. Bei den Addukten der restlichen zwei Reagenzien wurde die eutektische Temperatur zwischen diesen und dem Addukt benützt. Zum Teil wurden befriedigende Ergebnisse erhalten.

Mit Rücksicht auf die Übersichtlichkeit der Tabelle 3 seien im folgenden die Kristallformen und die bei und vor dem Schmelzpunkt zu beobachtenden Veränderungen beschrieben. Es bedeuten hierbei: P = Pikrolonat, St = Styphnat, T = Trinitrophloroglucinat.

Morphin P: lange Nadeln und Spieße, relativ scharfer Schmelzpunkt; St: erst nach längerem Stehen kräftige Nadeln, häufig amorph.

Heroin P: kräftige Nadeln, auch vereinzelt Plättchen, die sich bei zirka 180° in feine Nadeln umwandeln, bei 205° Tropfen; St: große plattenförmige Kristalle. Braunfärbung der Schmelze.

Permonid P: sternförmige, dicke Spieße und Nadeln; St: Nadeln und spießförmige Kristalle; T: zarte lange Nadeln, Schmelzen unter Zersetzung.

Dionin P: Nadeln, scharfer Schmelzpunkt; St: prismatische Kristalle in Büscheln, Tropfen bei 215°, Schmelzen unter Braunfärbung; T: prismatische Kristalle und Nadeln, Schmelzen unter Zersetzung.

Dromoran P: orangefarbene Körner; St: prismatische Kristalle, Gelbbraunfärbung der Schmelze infolge Zersetzung.

Eucodal P: rechteckige, prismatische Kristalle, gegen 240° bräunliche Tropfen, Schmelzen unter Zersetzung; St: lange, dicke Spieße, um 200° gelbe Tropfen, Schmelzen unter Zersetzung.

Dicodid P: Nadeln und Prismen, Tropfen um 230°, Schmelzbeginn 235° unter Zersetzung; St: Aggregate von Nadeln, ab 200° beginnende Braunfärbung infolge Zersetzung; T: Nadelbüschel, bei 220° beginnende Braunfärbung, Schmelzpunkt relativ scharf, hernach Verkohlung.

Acedicon P: Nadeln und Säulen, über 210° braune Tropfen, Schmelzen unter Zersetzung; St: Aggregate feiner Nadeln; T: lange Nadeln und Säulen.

Dolantin P: lange, dünne Nadeln, Schmelzpunkt unscharf; St: längliche Prismen, schmilzt scharf nach Erweichen bei 183°; T: fiederig verzweigte Kristalle, Tropfen bei 172°, scharfer Schmelzpunkt.

Hö 10720 (Viradon) P: Büschel kurzer, dünner Nadeln, scharfer Schmelzpunkt; St: kleine Nadeln, scharfer Schmelzpunkt; T: große Prismen, Schmelzpunkt scharf.

Polamidon (Algolysin) P: Aggregate kleiner Nadeln, erste Tropfen bei 114°; St: kurze Nadeln, Erweichen bei 150°; T: lange Nadeln*.

* *W. Hoffmann*[22] identifiziert das Polamidon u. a. mittels des Pikrats und Rhodanids.

Tabelle 3.

Analgetica Hydrochloride	Pikrolonate			Styphnate		Trinitroresorzinate	
	Schmelzpunkt	Eutektika mit		Schmelzpunkt	Eutekt. mit Styphninsäure	Schmelzpunkt	Eutektikum mit Trinitroresorcin
		Benzanilid	Salophen				
Morphin	190—191*	132	155	176—178	125		
Heroin**	205—215	171	170	209—216	135	196—200	125
Permonid	177—181	126	151	123—126	106	200—206	132
			Phenacetin				
Dionin	143—145	111	102	218—225	140	170—176	140
Dromoran	144—146	109	99	198—205	134		
		Salophen	Dicyandiamid				
Eucodal	245—255	183	190	208—212	135		
Dicodid	235—250	180	190	229	150 tr+	226	141
Acedicon	228—233	170	176	188—200	125	195—200	127
			Benzanilid				
Dolantin	182—190	160	134	183—185	132	190	120
			Dicyandiamid				
Cliradon	232	174 tr+	184	177—180	129	182—187	121
		Phenacetin	Benzanilid				
Polamidon (Algolysin)	156—160	113	121	150—153	111 tr+	178—183	120
		Salophen	Dicyandiamid				
Heptalgin	190—195	156	168	152—155	115	162—164	112
			Benzanilid				
Ticarda	187—189	156	136	124	96	164—167	111 tr+
Scopolamin HBr	174—178*	154	141	amorph		amorph	
Pilocarpin	179 (170—180*)	141	133	179—182*	133	143—145	103

* *Kofler* und *Müller*[1].

** *Kofler* und *Müller*[1] fanden bei den Pikrolonaten und Styphnaten des Heroins wesentlich niedrigere Schmelzpunkte. Diese Diskrepanz konnte nicht geklärt werden.

+ Träges Eutektikum.

Hö 10600 (Heptalgin) P: Aggregate kleinster, prismatischer Kristalle, vereinzelt Tropfen bei 180°; St: Nadeln und Spieße; T: Aggregate von Nadeln und Säulen, Schmelzpunkt scharf.

Ticarda P: dünne Prismen, Tropfen bei 180°, Schmelzpunkt relativ scharf; St: kurze, abgeschrägte Prismen, scharfer Schmelzpunkt: T: flache Kristalle.

Pilocarpin P: kubische Kristalle und Prismen, Schmelzpunkt scharf bei 179°, *Kofler* und *Müller* finden meist 170 bis 180°: St: lange, dicke Nadeln, schmilzt unter Gasbildung; T: prismatische Kristalle, schmilzt unter Gasbildung.

Scopolamin P: nach langem Stehen Sphärokristalle, Schmelzpunkt scharf, übereinstimmend mit *Kofler* und *Müller*[1]; St: ölige Tropfen, *Kofler* und *Müller* erzielten Sphärokristalle.

Die beiden letzten Alkaloide fanden hier Aufnahme, teils da sie in Gemischen mit Analgeticis vorkommen, teils weil sie zuweilen miteinander verwechselt werden.

Mit Hexanitrodiphenylamin geben folgende Analgetica amorphe Fällungen: Morphin (Fp = 138°), Heroin (123°), Permonid (11), Dionin (119°), Eucodal (127°), Dicodid (129°), Acedicon (120°), Heptalgin (62°). Der Wert dieser Fällungen im Hinblick auf die Identifizierung ist jedoch gering.

3. Spaltung der Addukte.

Läßt man eine Lösung der mit Nitrokörpern erhaltenen Addukte (in Chloroform oder in Chloroform mit 20% Aethanol, in einzelnen Fällen in einem Gemisch von zwei Teilen Chloroform und einem Teil Isopropanol) über eine Aluminiumoxydsäule (Merck, stand. n. Brockmann) laufen, so wird das Addukt gespalten, der Nitrokörper haftet fest als gelbe Zone im oberen Teil der Säule und im Eluat findet sich die reine Base. Man muß natürlich darauf achten, daß die Aluminiumoxydsäule (7 mm ∅ und 3 cm Länge) unten in einer Länge von zirka 1 cm weiß bleibt. Auf diese Weise wird bei der Untersuchung biologischen Materials eine zusätzliche Reinigung der Base ermöglicht. *Fischer* und *Chalupa*[13] haben darauf hingewiesen, daß die Pikrolonsäure für solche Zwecke besonders gereinigt werden muß, da sie Begleitstoffe enthält, die mit den in Betracht kommenden Lösungsmitteln eluiert werden und das Eluat verunreinigen.

Wir stellten Addukte der Analgetica mit Nitrokörpern dar, lösten 5 mg davon in den erwähnten Lösungsmitteln — s. die Tabelle 4 — und ließen diese Lösungen über die Aluminiumoxydsäule laufen. Nach gründlichem Durchwaschen wurde der Rückstand des Eluates gravimetrisch bestimmt. Er war immer rein weiß. Aus der Molekulargewichts-Relation wurde die aus 5 mg Addukt zu erwartende Menge der Base

berechnet. Wie man aus den Angaben der Tabelle 4 entnehmen kann, stimmen die Werte befriedigend überein, so daß von quantitativer Ausbeute gesprochen werden kann.

Tabelle 4. Spaltung von Addukten der Analgetica mit Nitrokörpern.

5 mg Addukt	gelöst in 5 ml	mg Base	
		gefunden	berechnet
Heroin-Pikrolonat	Chloroform	3,00	3,00
Morphin-Pikrolonat	Chloroform-Isopropanol	2,70	2,70
Permonid-Pikrolonat	Chloroform	2,50	2,50
Dionin-Styphnat	Chloroform	3,00	0,00
Dromoran-Styphnat	Chloroform	2,48	2,50
Eucodal-Pikrolonat	Chloroform-Aethanol	2,90	3,00
Dicodid-Styphnat	Chloroform-Isopropanol	2,65	2,70
Acedicon-Styphnat	Chloroform	2,90	3,20
Dolantin-Trinitrophloroglucinat	Chloroform	2,30	2,40
Cliradon-Pikrolonat	Chloroform-Isopropanol	2,35	2,40
Polamidon-Trinitrophloroglucinat	Chloroform	2,60	2,70
Heptalgin-Pikrolonat	Chloroform	2,80	2,90
Ticarda-Trinitrophloroglucinat	Chloroform	2,60	2,65

Das Nachwaschen der Aluminiumoxyd-Säule erfolgt mit 15 ml Lösungsmittel.

Für die freundliche Überlassung von Reinsubstanzen sei an dieser Stelle folgenden Firmen verbindlichst gedankt: Heyl & Co., Hildesheim, für das Kalignost; Farbwerke Höchst für Hö 10720, Hö 10600 und Ticarda: Hoffmann-La Roche, Basel, für Dromoran und Permonid; Sanabo, Wien, für Algolysin (Polamidon).

Zusammenfassung.

Zur einwandfreien Identifizierung von 13 Analgeticis und 17 Alkaloiden wurden von den Fällungen mit Tetraphenylbornatrium die Mikroschmelzpunkte und mehrere eutektische Temperaturen bestimmt. Außerdem wurden die Analgetica noch durch die Schmelzpunkte und eutektischen Temperaturen der Addukte mit Pikrolonsäure, Styphninsäure und Trinitrophloroglucin gekennzeichnet. Für jede Substanz stehen somit elf bzw. vier Zahlenwerte zur Verfügung. Schließlich wurde die Spaltung der Addukte mit Nitrokörpern auf einer Aluminiumoxydsäule quantitativ verfolgt.

Summary.

In order to identify with certainty 13 analgesics and 17 alkaloids, the micro melting points and several eutectic temperatures were determined of the precipitates with tetraphenyl boron sodium. Furthermore, the analgesics were characterized also by the melting points and eutectic temperatures of the addition compounds with picrolonic acid, styphnic acid, and trinitrophloroglucin. Accordingly, 11 respectively 4 values are available for each substance. Finally, the fission of the adducts with nitro compounds on an aluminum oxide column was followed quantitatively.

Résumé.

Pour une identification sure de 13 analgésiques et de 17 alcaloides, on détermine les micro-points de fusion et plusieurs des températures d'eutexie entre les précipités obtenus avec le tétraphénylbore-sodium. De plus, on caractérise les analgésiques par leurs points de fusion et par les températures d'eutexie des produits d'addition avec l'acide picrolonique, l'acide styphnique et le trinitrophloroglucinol. Pour chaque substance, on obtient par conséquent, onze respectivement quatre valeurs. Finalement, on effectue la séparation quantitative des produits d'addition avec les dérivés nitrés sur une colonne d'alumine.

Literatur.

[1] *L. Kofler* und *F. A. Müller*, Mikrochem. **22**, 43 (1937).
[2] *L. Kofler* und *H. J. Lennartz*, Mikrochem. **33**, 70 (1947).
[3] *L.* und *A. Kofler*, Mikromethoden zur Kennzeichnung organischer Stoffe und Stoffgemische. Innsbruck: Wagner. 1948.
[4] *C. Griebel*, Pharmaz. Ztg. **85**, 757 (1949).
[5] *R. Opfer-Schaum*, Österr. Apoth.-Ztg. **6**, 543 (1952).
[6] *E. Wegner*, Dtsch. Apoth.-Ztg. **91**, 109 (1951).
[7] *E. Vidic*, Arzneimittelforsch. **3**, 34 (1953). Arch. exper. Pathol. Pharmakol. **212**, 339 (1951).
[8] *M. Brandstätter*, Arzneimittelforsch. **3**, 33 (1953).
[9] *J. Breinlich*, Arzneimittelforsch. **3**, 93 (1953).
[10] *L.* und *A. Kofler*, Arch. Pharmaz. **272**, 537 (1934); **270**, 293 (1932).
[11] *R. Fischer* und *A. Moor*, Mikrochem. **15**, 74 (1934).
[12] *R. Fischer* und *W. Paulus*, Arch. Pharmaz. **273**, 83 (1935).
[13] *R. Fischer* und *L. Chalupa*, Mikrochem. **34**, 257 (1949).
[14] *G. Hesse*, Adsorptionsmethoden im chemischen Laboratorium. Berlin: W. de Gruyter & Co. 1943.
[15] *G. Wittig*, Ann. Chem. **563**, 118, 126 (1949).
[16] *P. Raff* und *W. Brotz*, Z. analyt. Chem. **133**, 241 (1951).
[17] *H. Flaschka*, Z. analyt. Chem. **136**, 2, 99 (1952).
[18] *H. Flaschka*, *A. Holasek* und *A. Amin*, Z. analyt. Chem. **138**, 161, 332 (1953).
[19] *H. Flaschka*, *A. Holasek* und *A. Amin*, Arzneimittelforsch. im Druck.
[20] *O. E. Schultz* und *G. Mayer*, Dtsch. Apoth.-Ztg. **92**, 358 (1952).
[21] *R. Opfer-Schaum*, Mikrochem. **31**, 324 (1944); **32**, 148 (1944).
[22] *W. Hoffmann*, Arzneimittelforsch. **3**, 364 (1953).

Aus der Chemischen Abteilung des Paracelsus-Institutes Bad Hall, Oberösterreich.

Über die Anreicherung kleinster Mengen elementaren Jods und seine mikroanalytische Trennung von ionisiertem Jod.

Von

H. Spitzy, H. Skrube und **F. S. Sadek.**

Mit 1 Abbildung.

(Eingelangt am 17. Juli 1953.)

Neuere Untersuchungen über die klinische Wirksamkeit der verschiedenen chemischen Zustandsformen des Jods zeigen, daß dem freien Jod im Vergleich zur ionisierten Form eine besondere Wirkung zukommt (*Häusler, Lauda* und *Siedek*[1]).

Bei Resorptionsuntersuchungen konnte kürzlich im Paracelsus-Institut in Tierversuchen festgestellt werden, daß elementares Jod im Vergleich zu Jodid, durch die Haut aus Badeflüssigkeiten aufgenommen, zu einer etwa 12fachen Speicherung in der Schilddrüse führt. Schließlich ist die aerogene Jodaufnahme an abgedunstetes freies Jod gebunden, dessen primäres Vorhandensein in Wässern gegeben sein muß. Voraussetzung für die eingehende Bearbeitung der sich aus diesen Befunden ergebenden Fragen bildete eine mikroanalytische Trennungsmöglichkeit kleinster Mengen elementaren Jods von einem großen Überschuß an ionisiertem Jod, wobei auf die besondere chemische Zusammensetzung der natürlichen Jodquellwässer Rücksicht zu nehmen war. Diese sind in Bad Hall, O.-Ö., Jodbromsolequellen mit einem durchschnittlichen Jodidgehalt[2] von 33 mg/l (maximaler Jodgehalt 58 mg/l). Es war naheliegend, das im Quellwasser vorkommende Jod auf seine chemischen Zustandsformen zu untersuchen, zeigte sich doch, daß bei dessen Speicherung im Verlauf von Monaten eine Freisetzung des Jods bis zu 25% des am Quellursprung als Ion vorhandenen Gesamtjods eintreten kann. Näheres über den Chemismus der Jodquellen von Bad Hall wird an anderer Stelle mitgeteilt werden[3].

Allgemeines.

Die bisher in der Praxis gebräuchlichen und aus der Literatur bekannten, direkten, analytischen Bestimmungsmethoden für elementares Jod sind in ihrer Leistungsfähigkeit an die Nachweisempfindlichkeit dieses Elementes gebunden. Nach *Malissa*[4] beträgt die praktische Empfindlichkeit der Jodstärkereaktion pD — 7. Diesen Wert konnten auch *Ballczo* und *Mondl*[5] mit der von ihnen angegebenen Kaliumchlorid-Salicylsäure-Stärkelösung bestätigen. In letzter Zeit empfehlen *Miller* und *Bracken*[6] Polyvinylalkohol mit 20 Molprozent Acetatgruppen als Indikator, dessen Empfindlichkeit um eine Zehnerpotenz größer ist. Auch die Empfindlichkeit der Dead-Stop-Methode (Nullpunktsmethode) von *Mitchell* und *Smith*[7] mit einer Endpunkterkennung auf einen Tropfen 0,005-n Jodlösung bei Titration mit Natriumthiosulfatlösung reicht für die vorliegende Fragestellung nicht aus. Die Anwendung des eleganten Verfahrens zur Messung kleinster Jodkonzentrationen von *Ehmert*[8] mit einer Meßgrenze von 0,001 μg Jod/ml ist nur unter der Voraussetzung möglich, daß sich in der zu untersuchenden Flüssigkeit keinerlei Schwebstoffe befinden, da diese durch Anprall an die rotierenden Elektroden, mit Hilfe deren die quantitative Messung der Depolarisationsfähigkeit von Lösungen erfolgt, starke Störungen verursachen. Im natürlichen Quellwasser sind jedoch Schwebstoffe oftmals vorhanden.

Folgende Wege wurden für die auszuarbeitende Methode, die eine Anreicherung und Bestimmung einiger Mikrogramm elementaren Jods neben der vieltausendfachen Menge ionisierten Jods aus großen Flüssigkeitsvolumen erlauben sollte, in Betracht gezogen:

1. Übertreiben des elementaren Jods durch Destillation;
2. Anreicherung des elementaren Jods an Adsorbentien, im besonderen an Aktivkohlen;
3. Extraktion des elementaren Jods mit geeigneten Lösungsmitteln.

Die Abtrennung von Mikrogramm-Mengen elementaren Jods aus größeren Flüssigkeitsvolumen durch Wasserdampfdestillation unter atmosphärischem bzw. vermindertem Druck nach dem Vorgehen von *Leipert*[9], sowie die Verwendung von Trägergas (*Zacherl* und *Stöckl*[10]) zeigte unbefriedigende Ergebnisse, da es ohne p_H-Änderung unmöglich war, das Jod quantitativ zu erfassen. Eine Änderung des p_H-Wertes gegen den sauren Bereich in natürlichem Jodquellwasser führt jedoch zu einer erheblichen, zeitabhängigen Umwandlung des Jodids in elementares Jod.

Aus der Jodwasserzuleitung einer Badekabine wurde Jodwasser entnommen (344 μg Gesamtjod/10 ml). Dieses Wasser, dessen ursprünglicher p_H-Wert bei 7,55 lag, wurde in drei verschiedenen Chargen auf die p_H-Werte 3,90, 3,20 und 1,00 mit verdünnter Schwefelsäure eingestellt. Von diesen Chargen wurden nach Einstellen des p_H-Wertes in Zeitabständen (sofort, 1, 2, 3 Stunden usw.) 10 ml-Proben zur Bestimmung des Jodgehaltes entnommen.

Wie aus Abb. 1 zu entnehmen, führt die zunehmende Verschiebung in den sauren Bereich zur Freisetzung von Jod, die z. B. bei $p_H = 1$ bereits nach 60 Minuten 65% des ursprünglich vorhandenen Totaljods beträgt. Auch bei $p_H = 3{,}9$ ist z. B. nach 5 Stunden ein Wert von 9,1% zu entnehmen. Analog wurde eine frisch bereitete Kaliumjodidlösung (Merck p. a.) gleicher Jodkonzentration auf die gleichen p_H-Werte eingestellt und ihr Gehalt an Jod zu den gleichen Zeiten zu bestimmen versucht. Die Proben wurden wie die Jodwasserproben im Dunkeln aufbewahrt. Diese Vergleichsserie wurde angesetzt, da bekanntlich aus höher konzentrierten Jodidlösungen elementares Jod freigesetzt wird. Die vorliegende Jodidkonzentration mit 344 μg/10 ml zeigte jedoch selbst nach zweimonatiger Lagerung kein durch die Jodstärkereaktion faßbares elementares Jod.

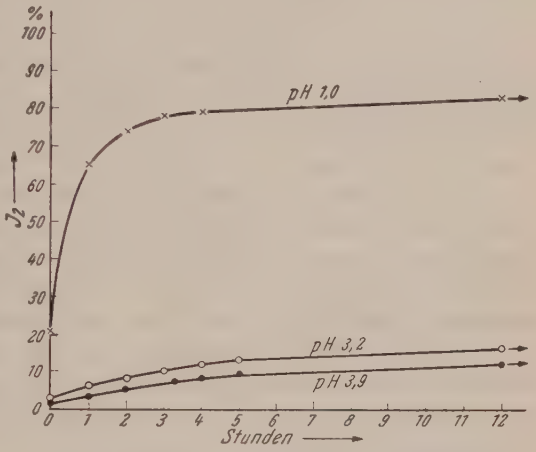


Abb. 1. J_2-Gehalt in % des Totaljods von natürlichem Jodquellwasser in Abhängigkeit von pH und Zeit.

Da die Anwendung der Destillation unbrauchbare Ergebnisse erbrachte, wurde in der Folge versucht, das elementare Jod an Adsorbentien, im besonderen an Aktivkohlen, anzureichern und zu bestimmen. Über diese Möglichkeit der quantitativen Jodbindung ist kürzlich von *Stempel*[11] eine Veröffentlichung erschienen, in der dargelegt wird, daß Aktivkohle „Merck 2184" aus wässerigen Lösungen bei p_H 6 bis 7 elementares Jod quantitativ adsorbiert und so die Trennung von Alkali- und Erdalkalihalogeniden gestattet. Die Versuche, dieses aussichtsreich erscheinende Trennungsverfahren in den Mikromaßstab zu übertragen, brachten durchwegs unbefriedigende Ergebnisse. Über die umfangreichen Untersuchungen der adsorptiven Bindung von elementarem Jod sowie über die Ursachen des Versagens dieser Methode wird an anderer Stelle ausführlich berichtet (*Spitzy, Skrube* und *Sadek*[12]).

Zur Methodik.

Die zunehmende Anwendung der Extraktion für die Anreicherung von Spurenelementen neben großen Mengen von Fremdionen (s. z. B. *Gorbach* und *Pohl*[13]) durch Wahl selektiver Lösungsmittel legte die Anwendung dieser Arbeitstechnik auch bei der vorliegenden Fragestellung nahe; dies um so mehr, als gerade für die Extraktion des elementaren Jods eine Reihe von seit langem gebräuchlichen, geeigneten organischen

Lösungsmitteln zur Verfügung steht (Benzol, Chloroform, Schwefelkohlenstoff, Tetrachlorkohlenstoff u. a.). Die praktische Unlöslichkeit der Jodide und aller im natürlichen Jodquellwasser vorhandenen Ionen im organischen Lösungsmittel beseitigt die Hauptgefahr einer Störung bei der analytischen Abtrennung, die in einer allfälligen Oxydation des Jodids zu elementarem Jod liegen könnte. Auch die Schnelligkeit der Durchführung eines Extraktionsverfahrens schaltet Verluste an elementarem Jod während der analytischen Operationen aus.

Die Extraktion von freiem Jod mit Tetrachlorkohlenstoff wird schon in der klassischen Analyse von *Fresenius* zur Bestimmung von Jodid neben Brom und Chlor verwendet. Mit dieser Methode erfaßbare Mengen elementaren Jods liegen jedoch wie jene nach dem Verfahren von *Liebhafsky*[14] — mit einer Anwendbarkeit bis zu Jodkonzentrationen von maximal $2 \cdot 10^{-6}$-m — weit über den bei der vorliegenden Fragestellung zu bestimmenden Größenordnungen. Als Extraktionsmittel wurde Tetrachlorkohlenstoff gewählt, da dieser neben einer geeigneten Löslichkeit von nur 0,077 g/100 g Wasser bei 25° C einen günstigen Verteilungskoeffizienten (K = 110) besitzt. Dieser „wirkliche Verteilungskoeffizient" zwischen Tetrachlorkohlenstoff und Wasser wird für 20 und 30° C unabhängig von der Jodkonzentration angegeben. Der experimentell bestimmte K-Wert nimmt jedoch mit der Jodkonzentration und Temperatur in Übereinstimmung mit dem Verteilungskoeffizienten anderer Lösungsmittel zu (*Gmelin*[15]).

Ausgehend von der Annahme, daß 7 μg elementares Jod in 500 ml Wasser vorhanden seien, wurden die Ausbeuten an extrahiertem Jod mit verschiedenen Mengen des Extraktionsmittels und verschiedener Anzahl von Extraktionen nach dem *Nernst*schen Verteilungssatz theoretisch berechnet. Danach ergibt sich bei einer dreistufigen Extraktion mit je 20 ml Tetrachlorkohlenstoff eine theoretisch in der wässerigen Lösung verbliebene Jodmenge von 0,0447 μg Jod (Minusfehler 0,64%), eine Menge, die bei der titrimetrischen Bestimmung von Mikrogramm-Mengen erfahrungsgemäß innerhalb der Fehlergrenze liegt. Wendet man die vierstufige Extraktion an, so gelangt man zu einer theoretischen Fehlausbeute von 0,118%, entsprechend 0,0083 μg Jod. Bevor an Modelllösungen die Methode ausgearbeitet werden konnte, sollte zuvor mit ^{131}J sichergestellt sein, daß bisher analytisch nicht faßbare kleinste Mengen elementaren Jods in wässeriger Lösung unmittelbar nach Bereitung als solche erhalten bleiben und extrahierbar sind. Gleichzeitig wurden die theoretisch berechneten Extraktionsausbeuten mit Hilfe von Radiojod experimentell überprüft.

Radiochemische Untersuchungen (*Hellauer* und *Spitzy*[16]) über Gleichgewichts- und Austauschvorgänge von Jod und Jodid ergaben, daß sich bei Zusatz von ^{131}J (als Jodid-Ion) zu einer wässerigen elementaren Jodlösung

das Gleichgewicht unter Austausch der Lösungsgenossen in kürzerer Zeit als 15 Sekunden einstellt. Schüttelt man demnach eine mit $^{131}J^-$ versetzte wässerige Lösung von elementarem Jod mit Tetrachlorkohlenstoff aus, so geht praktisch die gesamte Aktivität in die Tetrachlorkohlenstoffphase über und kann dort in einem Flüssigkeitszählrohr gemessen werden. Diese Ergebnisse führten zu folgenden Versuchen:

a) Prüfung der Stabilität von kleinsten Jodkonzentrationen in wässeriger Lösung. Probe 1: 500 ml, enthaltend 10,7 μg Jod in aqua bidest.; Probe 2: 500 ml, enthaltend 2010 μg Jod in aqua bidest. (188fache Konzentration von Probe 1). Beide Proben wurden unter Auswertung der oben beschriebenen Austauschvorgänge mit je 0,25 μC $^{131}J^-$ versetzt und mit 20 ml Tetrachlorkohlenstoff extrahiert. Die Strahlung von 10 ml des Extraktes jeder Probe wurde sodann im Flüssigkeitszählrohr gemessen. Die erhaltenen Aktivitätswerte waren praktisch identisch. Dies besagt, daß elementares Jod im Mikrogramm-Bereich in wässeriger Lösung unmittelbar nach Bereitung als solches durch Extraktion erfaßt wird.

b) Die mit Hilfe von Radiojod experimentell ermittelten Extraktionsausbeuten stimmten mit den errechneten weitgehend überein.

Die zu erwartenden Mikrogramm-Mengen elementaren Jods in einem Volumen von 60 bis 80 ml Tetrachlorkohlenstoff ließen eine direkte Bestimmung des Jods im Sinne einer *Fresenius*-Titration oder nach der Methode von *Liebhafsky*[14] nicht zu. Ein Einengen der Extrakte schied wegen der Flüchtigkeit des Jods von vornherein aus. Es blieb somit nur der Weg der Umwandlung des im Lösungsmittel vorhandenen elementaren Jods in ionisierte Zustandsformen (JO^-, J^-, JO_3^-) durch Schütteln der organischen Extrakte mit einer alkalischen wässerigen Lösung. In dieser konnte die Bestimmung des Jods durch *Winkler*-Titration erfolgen.

In Vorversuchen wurde die Umwandlung in ionisiertes Jod durch dreimaliges Schütteln der vereinigten Tetrachlorkohlenstoffextrakte mit je 20 ml 0,2-n Kalilauge vorgenommen. Diese Maßnahme erwies sich bei Verfeinerung der Arbeitsmethodik als unnotwendig. Dies war insofern bedeutungsvoll, als bei dem der Umwandlung folgenden Neutralisieren nach Einengen der alkalischen Probelösung mit verd. Schwefelsäure Kaliumsulfat entsteht, dessen Einfluß auf die Mikrotitration von Jod mit Natriumthiosulfat berücksichtigt werden mußte. Nach den Störungsdiagrammen von *Reith*[17] stören Sulfationen zwar nicht, soferne sie bis zu Konzentrationen von 60 mg in 5 ml Probelösung vorliegen. Zur Sicherheit überprüften wir bei extremen Bedingungen den Einfluß von Kaliumsulfat auf die Ergebnisse der *Winkler*-Titration (Tabelle 1).

Da kein Einfluß von 17,4 mg Kaliumsulfat auf die Endbestimmung des Jods in 8 ml Volumen bei der *Winkler*-Titration festzustellen war, wurde untersucht, ob die Anwendung der äquivalenten Menge (20 ml 0,005-n) Kalilauge für die Umwandlung des elementaren Jods genügt. Zur Vereinfachung der Methode sollte auch geprüft werden, ob ein dreimaliges Behandeln der Extrakte mit der alkalischen wässerigen Lösung erforderlich ist, um quantitative Ergebnisse zu erhalten. Wie aus

Tabelle 1.

	I		II		III	
	ohne K_2SO_4	mit 2,1 g K_2SO_4	ohne K_2SO_4	mit 174 mg K_2SO_4	ohne K_2SO_4	mit 17,4 mg K_2SO_4
	titriert in 30 ml		titriert in 10 ml		titriert in 8 ml	
ml Verbrauch	$V_1 = 0{,}98$	$V_1 = 0{,}98$	$V_1 = 1{,}95_5$	$V_1 = 1{,}96_0$	$V_1 = 0{,}21_5$	$V_1 = 0{,}21_5$
0,005-n $S_2O_3^{--}$	$V_2 = 0{,}96$	$V_2 = 0{,}99$	$V_2 = 1{,}95_0$	$V_2 = 1{,}95_5$	$V_2 = 0{,}21_0$	$V_2 = 0{,}21_5$
log F für I =	$V_3 = 0{,}97$	$V_3 = 1{,}01$	$V_3 = 1{,}95_5$	$V_3 = 1{,}96_0$	$V_3 = 0{,}21_5$	$V_3 = 0{,}21_0$
99568; für II	$V_4 = 0{,}97$	$V_4 = 0{,}98$	$V_4 = 1{,}95_5$	$V_4 = 1{,}96_0$	$V_4 = 0{,}21_5$	$V_4 = 0{,}21_2$
und III = 99140	$V_5 = 0{,}97$	$V_5 = 1{,}00$	—	—	$V_5 = 0{,}21_0$	$V_5 = 0{,}21_5$
Mittel ml	0,97	0,99	$1{,}95_4$	$1{,}95_4$	$0{,}21_3$	$0{,}21_3$
μg gefunden	101,6	103,7	202,6	203,1	$22{,}0_8$	$22{,}0_8$
Differenz in μg mit K_2SO_4	—	+ 2,1	—	+ 0,5	—	$\pm$ 0,0
Differenz in % mit K_2SO_4	—	+ $2{,}0_6$	—	+ $0{,}2_5$	—	$\pm$ 0,0

Tabelle 2 zu entnehmen ist, genügt bereits eine einmalige Behandlung mit 20 ml 0,005-n Kalilauge, da die Aufarbeitung der zweiten und dritten alkalischen wässerigen Lösung den gesondert bestimmten Blindwert von 0,04 ml Verbrauch 0,005-n Thiosulfat ergab.

Tabelle 2.
Ursprüngliche Menge × 6

Versuch Nr.	gegeben		Verbrauch ml 0,005-n $S_2O_3^{--}$		J_2 n. Extr. in μg	Blindwert in μg	gefunden J_2 in μg Blindw. berücks.	Diff. in μg	Bemerkung
	μg J_2	mg J'	Probe	Blindwert					
1	20,6	50,5	a) $0{,}19_5$	$0{,}03_0$	20,3	3,1	17,2		a) Extr. 4 · 20 ml
			b) $0{,}04_5$	$0{,}03_0$	4,7	3,1	1,6		b) CCl_4 umgewandelt mit 10 ml
			c) $0{,}03_0$	$0{,}03_0$	3,1	3,1	—		c)
							18,8	—1,8	0,01-n Kalilauge
2	20,3	50,5	a) $0{,}23_5$	$0{,}04_0$	24,3	4,2	20,1		a) Extr. 4 · 20 ml
			b) $0{,}04_0$	$0{,}04_0$	4,2	4,2			b) CCl_4 umgewandelt mit 20 ml
			c) $0{,}04_0$	$0{,}04_0$	4,2	4,2			c)
							20,1	—0,2	0,005-n Kalilauge
3	20,3	50,5	a) $0{,}23_0$	$0{,}04_0$	23,8	4,2	19,6		a) Extr. 4 · 20 ml
			b) $0{,}04_0$	$0{,}04_0$	4,2	4,2			b) CCl_4 umgewandelt mit 20 ml
			c) $0{,}04_0$	$0{,}04_0$	4,2	4,2			c)
							19,6	0,7	0,005-n Kalilauge

Bemerkung: Versuch Nr. 1 ergibt erst mit der zweiten Behandlung ein quantitatives Ergebnis, da nur mit 10 ml 0,01-n Kalilauge geschüttelt wurde. Bei den Versuchen Nr. 2 und 3 gelangte die gleiche Alkalimenge zur Anwendung, jedoch im doppelten Flüssigkeitsvolumen (20 ml).

Versuche mit Hydroxylamin zur Reduktion des elementaren Jods zu Jodidion ergaben leichte Minuswerte bei der Jodidbestimmung; seine Anwendung auf die Extraktionsmethode erbrachte in zwei Fällen nicht verwertbare Ergebnisse.

Um Mikrogramm-Mengen Jod titrimetrisch leichter bestimmbar zu machen, wurde die Potenzierung des extrahierten Jods versucht. Bei der Vervielfachung so geringer Jodmengen machen sich die von *Rappaport* und *Engelberg*[18] bzw. *Geilmann* und *Barttlingck*[19] hervorgehobenen Schwierigkeiten geltend. Diese Autoren, sowie *Zacherl* und *Stöckl*[10] isolieren das bei der Potenzierung entstehende Jod durch Wasserdampfdestillation, bzw. durch Austreiben mit Hilfe eines Trägergases. Sie führen die Potenzierung auch nur bis zur 36fachen Menge des ursprünglich vorhandenen Jods. Wie aus den später gebrachten Ergebnissen hervorgeht, ist eine Potenzierung bis zur 216fachen Menge des ursprünglich vorhandenen Jods möglich, wobei die Isolierung des elementaren Jods durch Extraktion, damit also an keine wesentlichen apparativen Erfordernisse gebunden, vorgenommen werden kann. Die Resultate sind den durch Destillation erzielten gleichwertig. Diese Potenzierung macht es möglich, an sich vorhandene Mikrogramm-Mengen Jods einfach mit Halbmikrobüretten unter Verwendung von Thiosulfatlösungen gerade noch günstiger Normalität zu bestimmen.

Für die Durchführung der Anreicherung und quantitativen Bestimmung kleinster Mengen elementaren Jods hat sich schließlich nachstehende Arbeitsvorschrift als geeignet erwiesen:

Reagenzienbedarf:

500 ml Probelösung,
Tetrachlorkohlenstoff p. a. Merck,
0,005-n Kalilauge,
Aqua bidestillata,
Methylorange, 0,1%ig,
Schwefelsäure, 2%ig,
Bromwasser frisch aus Brom, p. a. Merck,
Kaliumjodid, p. a. Merck,
Stärkelösung nach *Ballczo* und *Mondl*[5],
0,005-n Thiosulfatlösung.

Gerätebedarf:

1 750-1000-ml-Schütteltrichter,
2 200-ml-Schütteltrichter,
2 1-ml-Pipetten, geeicht,
3 20-ml-Pipetten, ungeeicht,
1 200-ml-Becherglas,
1 50-ml-Titrierkolben,
1 3-ml-Bürette mit $^1/_{100}$-Teilung,
1 Metallspatel,
1 Mikrospritzflasche,
Glaskügelchen.

Bemerkung: Die Reinigung und Vorbereitung der Gefäße (Schütteltrichter u. a.) ist mit besonderer Sorgfalt vorzunehmen, da Verluste der zu bestimmenden Mikrogramm-Mengen Jod durch Adsorption an Glas, Glasstöpseln, Schliffhähnen usw. entstehen können.

Die zur Verwendung gelangenden Gefäße werden mit Chromschwefelsäure gereinigt, sodann *gründlich* mit heißem Wasser und anschließend mit dest. Wasser gespült. Zur Vermeidung der Adsorptionsverluste werden die Schüttel-

trichter sodann mit verdünnter wässeriger Jodlösung behandelt und nach einiger Zeit mit verd. Jodidlösung gespült. Ein abermaliges gründliches Nachwaschen mit dest. Wasser wird angeschlossen.

Für die Umwandlung des Jods in ionisiertes Jod sind stets die gleichen Gefäße zu verwenden.

Arbeitsvorschrift.

500 ml der zu untersuchenden wässerigen Lösung werden in einem 750 bis 1000-ml-Schütteltrichter viermal mit je 20 ml Tetrachlorkohlenstoff je 1 Minute kräftig ausgeschüttelt. Bei der nach 2 Minuten folgenden Abtrennung der jeweiligen Extrakte von der wässerigen Phase ist darauf zu achten, daß kein Tropfen der wässerigen Lösung in die zu vereinigenden Extrakte gelangt, was durch das Zurücklassen von etwa 0,1 ml Tetrachlorkohlenstoff im Schütteltrichter bei der Abtrennung durch rechtzeitiges Schließen des Hahnes erreicht wird. Die in einem zweiten Schütteltrichter vereinigten vier Extrakte (80 ml Tetrachlorkohlenstoff) werden zur Befreiung allfällig adsorptiv mitgerissener Jodidionen mit 20 ml dest. Wasser gründlich gewaschen. Nach Abtrennung der beiden Phasen wird der Tetrachlorkohlenstoffextrakt mit 20 ml 0,005-n Kalilauge geschüttelt, abgetrennt und der Schütteltrichter mit aqua bidest. nachgewaschen, bis das Gesamtvolumen der wässerigen Lösung 40 ml beträgt. Nach Einengen der Lösung auf 12 ml wird verd. Schwefelsäure tropfenweise gegen 1 Tropfen zugesetztes Methylorange bis zum Umschlag auf Rosa zugegeben. Sodann wird 1 ml frisch bereitetes Bromwasser zugesetzt, genau 4 Minuten gekocht, die Lösung rasch erkalten gelassen und nach Zugabe von Kaliumjodid (fest) aus einer Bürette ($^1/_{100}$ Teilung, $^2/_{1000}$ schätzbar) gegen Stärke mit 0,005-n Thiosulfatlösung titriert.

Berechnung der Ergebnisse (gegebene Jodmenge · 6): 0,1 ml 0,005-n Thiosulfatlösung entspricht 10,58 μg Jod.

Arbeitsvorschrift für die Potenzierung.

Im Falle der Potenzierung zur 36fachen Menge des ursprünglich vorhandenen Jods wird die obige Arbeitsvorschrift bis zur Zugabe von Kaliumjodid (fest) verwendet. Die Lösung wird sodann unmittelbar mittels eines kleinen Trichters in einen Schütteltrichter überführt, mit 30 ml Wasser nachgewaschen und einer abermaligen dreistufigen Extraktion (je 20 ml) unterworfen und wie oben weiterbehandelt.

Berechnung der Ergebnisse (gegebene Jodmenge · 36): 0,1 ml 0,005-n Thiosulfatlösung entspricht 1,763 μg Jod.

Bei Anwendung der Potenzierung zur 216fachen Menge des ursprünglichen vorhandenen Jods wird noch einmal im gleichen Sinne verfahren.

Berechnung der Ergebnisse (gegebene Jodmenge · 216): 0,1 ml 0,005-n Thiosulfatlösung entspricht 0,294 μg Jod.

Zu jeder Probe, insbesondere bei Verwendung neuer Lösungen, ist eine Blindwertbestimmung anzusetzen, deren Verbrauch an 0,005-n Thiosulfat vom Verbrauch der Probe bei der Berechnung abzuziehen ist.

Beleganalysen.

Eine willkürliche Zusammenstellung von mit dieser Methode erzielten Ergebnissen zeigt Tabelle 3.

Tabelle 3.

Versuch Nr.	gegeben μg J_2 mg J'	gefunden μg J_2 Blindw. berücks.	Diff. μg J_2	Verbrauch ml 0,005-n $S_2O_3^{--}$ Probe	Verbrauch ml 0,005-n $S_2O_3^{--}$ Blindw.	μg Jod n. Umwandl.	Blindwert	Bemerkung
			Ursprüngliche Menge · 6					
1	20,3 50,5 1:2431	20,0	—0,3	$0{,}23_4$	$0{,}04_0$	24,2	4,2	Extrakte 4 · 20 ml umgewandelt mit
2	20,3 50,5 1:2431	20,0	—0,3	$0{,}23_4$	$0{,}04_0$	24,2	4,2	20 ml 0,005-n Kalilauge
3	20,3 50,5 1:2431	20,2	—0,1	$0{,}23_8$	$0{,}04_0$	24,4	4,2	
			Ursprüngliche Menge · 36					
4	6,8 70,0 1:10294	6,7	—0,1	$0{,}52_0$	$0{,}14_5$	8,9	2,2	Extrakte 3 · 20 ml mit 20 ml 0,005-n
5	6,8 70,0 1:10294	6,3	—0,5	$0{,}49_7$	$0{,}14_5$	8,5	2,2	Kalilauge umgewandelt
6	6,8 70,0 1:10294	6,9	+0,1	$0{,}53_2$	$0{,}14_5$	9,1	2,2	
7	6,4 70,0 1:10938	6,3	—0,1	$0{,}49_7$	$0{,}14_5$	8,5	2,2	
8	20,4 50,5 1:2475	20,1	—0,3	$1{,}30_5$	$0{,}14_5$	22,3	2,2	
9	20,4 50,5 1:2475	20,2	—0,2	$1{,}31_5$	$0{,}14_5$	22,4	2,2	
10	20,4 50,5 1:2475	20,1	—0,3	$1{,}31_0$	$0{,}14_5$	22,3	2,2	
			Ursprüngliche Menge · 216					
11	5,1 50,1 1:9824	4,9	—0,2	3,12	$1{,}40_3$	8,9	4,0	Umwandlung wie unter 4—10
12	5,1 50,1 1:9824	4,7	—0,4	3,04	$1{,}40_3$	8,7	4,0	

Praktische Anwendung der Methode.

Die beschriebene Methode hat für die Untersuchung der Jodquellwässer und für die Bearbeitung verschiedener balneologischer Fragestellungen praktische Bedeutung erlangt und sich bereits bewährt. Wie eingangs erwähnt, kommt dem freien Jod hinsichtlich der Resorption und seiner klinischen Wirksamkeit eine besondere Bedeutung zu, selbst wenn es bei Jodbädern (180 l) in Konzentrationen von wenigen μg/l neben der vielfachen Menge an ionisiertem Jod vorliegt.

Klinische Befunde (*Häusler* und *Siedek*[20]), wonach die Verabreichung natürlicher Jodsolebäder gleichsinnige, aber stark streuende Veränderungen der physikalischen Kreislaufgrößen hervorrief, hingegen Modellbäder mit gemessenen Mengen elementaren Jods zu konstant beeinflußten Kreislaufgrößen führten, lassen sich durch den mit der beschriebenen Methode festgestellten stark schwankenden Gehalt an elementarem Jod in natürlichem Jodquellwasser erklären. Seine regelmäßige Bestimmung ist nunmehr mit dieser Methode möglich; desgleichen konnte das aus bereiteten Jodbädern in die Luft entweichende elementare Jod mit seinerzeit von *Spitzy*[21] bestimmten Luftjodmengen in Badekabinen in Beziehung gesetzt werden. Aus therapeutischen Gründen mit Kohlensäure bereitete Jodbäder zeigen offenbar durch p_H-Verschiebung gegen den sauren Bereich (1.8 bis 1,9 Einheiten) eine Steigerung des ursprünglichen Gehaltes an elementarem Jod auf das Dreifache (s. auch Abb. 1). Schließlich konnte die beschriebene Methode erfolgreich für die eingehende Bearbeitung sowohl der perkutanen als auch der aerogenen Aufnahme von Jod eingesetzt werden.

Für die Förderung dieser Arbeit danken wir Herrn Prof. Dr. *H. Lieb*. Universität Graz.

Zusammenfassung.

Für die mikroanalytische Bestimmung von Mikrogramm-Mengen elementaren Jods neben ionisiertem Jod wird eine Methodik auf Extraktionsbasis angegeben. Sie erlaubt die quantitative Erfassung von 4 μg Jod neben der 10000fachen Menge Jodid. Das elementare Jod wird in einer vierstufigen Extraktion mit Tetrachlorkohlenstoff angereichert; das in den Extrakten befindliche elementare Jod wird durch Behandlung mit Kalilauge in ionisiertes Jod übergeführt. Nach Einengen der Lösung wird der Jodgehalt maßanalytisch nach *Winkler* bestimmt. Eine Potenzierung des in der Probe enthaltenen Jods auf die 36- und 216fache Menge ist möglich, wobei die Ergebnisse den durch Destillation erzielten ebenbürtig sind.

Die erfolgreiche praktische Anwendung der ausgearbeiteten neuen Trennungsmethode auf natürliches Jodquellwasser und verschiedene balneologische Fragestellungen stellt die Brauchbarkeit dieses Verfahrens unter Beweis.

Summary.

An extraction method is described for the microanalytical determination of microgram quantities of elementary iodine accompanied by ionized iodine. It permits the quantitative determination of 4 μg iodine in the presence of 10000 times the quantity of iodide. The elementary iodine is collected by a 4-stage extraction with carbon tetrachloride; the elementary iodine in the extracts is converted to ionized iodine by treatment with potassium hydroxide. After concentrating the solution, the iodine content is determined

volumetrically by the *Winkler* method. It is possible to amplificate the iodine in the sample to 36- and 216 times the quantity, and the results are then as good as those obtained by distillation.

The successful practical application of the new method of separation to natural iodine springwaters and various balneological questions demonstrate the usefulness of this procedure.

Résumé.

On donne une méthode de microdosage de l'iode élémentaire sur des quantités de l'ordre du microgramme, basée sur l'extraction, à côté de l'iode ionisé. Elle permet la quantité de 4 μg d'iode par litre à côté de 10000 fois cette quantité d'iodure. L'iode élémentaire est concentré à l'aide du tétrachlorure de carbone par extraction à quatre étages. Dans l'extrait, on trouve l'iode élémentaire qui, par traitement avec la potasse est transformé en iode ionisé. Après concentration de la solution, on dose volumétriquement la teneur en iode suivant *Winkler*. Il est possible d'amplifier l'iode dans la prise à 36 et 216 fois la quantité, et les résultats sont égaux à ceux obtenus par distillation.

L'application pratique couronnée de succès de la nouvelle méthode de séparation élaborée aux eaux de source iodées naturelles et à diverses questions balnéologiques, montre l'utilité de ce procédé.

Literatur.

[1] *H. Ph. Häusler, E. Lauda* und *H. Siedek*, Wr. klin. Wschr. **60**, 623 (1951).
[2] *H. Lieb* und *H. Spitzy*, Arch. physikal. Ther. Balneologie **4**, 275—294 (1952).
[3] *H. Spitzy* und *H. Skrube*, Publikation in Vorbereitung.
[4] *H. Malissa*, Analyt. Chim. Acta **4**, 1 (1950).
[5] *H. Ballczo* und *G. Mondl*, Mikrochem. **36/37**, 997 (1951).
[6] *S. A. Miller* und *A. Bracken*, J. Chem. Soc. London **1951**, 1928.
[7] *J. Mitchell* and *Smith*, Aquametry. New York: Interscience. 1949.
[8] *A. Ehmert*, Z. Naturforsch. **4** b, 321 (1949).
[9] *Th. Leipert*, Biochem. Z. **261**, 436 (1933); **270**, 448 (1934); **280**, 416 (1935).
[10] *M. K. Zacherl* und *W. Stöckl*, Mikrochem. **38**, 278 (1951).
[11] *B. Stempel*, Z. analyt. Chem. **133**, 412 (1951).
[12] *H. Spitzy, H. Skrube* und *F. S. Sadek*, Z. analyt. Chem. im Druck.
[13] *G. Gorbach* und *F. Pohl*, Mikrochem. **36/37**, 486 (1951).
[14] *H. A. Liebhafsky*, J. Amer. Chem. Soc. **53**, 165 (1931).
[15] *Gmelin*, Handbuch der anorganischen Chemie, System Nr. 8 „Jod", Berlin: Verlag Chemie. 1933.
[16] *H. Hellauer* und *H. Spitzy*, Biochem. Z. im Druck.
[17] *J. F. Reith*, Biochem. Z. **216**, 249 (1929).
[18] *F. Rappaport* und *A. Engelberg*, Mikrochem. **10**, 1 (1934).
[19] *W. Geilmann* und *H. Barttlingck*, Mikrochem. **30**, 217 (1942).
[20] *H. Ph. Häusler* und *H. Siedek*, Cardiologia **22**, 1 (1953).
[21] *H. Spitzy*, Mikrochem. **39**, 196 (1952).

Aus dem Pharmakognostischen Institut der Universität Graz.

Zur Analyse von Flüssigkeiten, speziell fetten Ölen und Salzlösungen mit Hilfe der Mikrobestimmung der kritischen Mischungstemperatur.

Von

R. Fischer und J. Horner.

Mit 3 Abbildungen.

(Eingelangt am 17. Juli 1953.)

Die Mikrobestimmung der kritischen Mischungstemperatur (MTk)* hat sich bereits in einer Anzahl von Fällen für die Analyse von binären Gemischen als brauchbar erwiesen[1,2,3]. Wir haben nun das mit kleinsten Mengen arbeitende Verfahren auch als Schnellbestimmungsmethode für die Prüfung fetter Öle und zur Analyse von Salzlösungen verwendet.

Zur Bestimmung der MTk läßt man in eine Glaskapillare von 0,3 bis 0,7 mm Durchmesser annähernd gleiche Mengen zweier Flüssigkeiten je etwa 8 mm hoch aufsteigen, schmilzt beiderseits zu, zentrifugiert und erhitzt die nicht über 30 mm lange Kapillare auf einem *Kofler*schen Mikroskopheiztisch, auf dem diese mittels eines geschlitzten Metallplättchens in einem Objektverschieber befestigt ist. Man stellt den Meniskus zwischen beiden — in der Kälte natürlich nicht mischbaren — Flüssigkeiten im Gesichtsfeld ein, erhitzt, bis er verschwindet, kühlt langsam wieder ab und bestimmt die Temperatur, bei der der Meniskus infolge Entmischung wieder sichtbar wird, da die Entmischung schärfer zu beobachten ist als die Mischung. Die Dauer der Analyse beträgt 10 bis 15 Minuten, die Ablesegenauigkeit auf dem *Kofler*-Heiztisch $\pm 0{,}3°$. Als Voraussetzung für eine quantitative Analyse eines *Gemisches* zwischen 0 und 100% ist im allgemeinen anzusehen, daß beide Komponenten jeweils eine praktisch erreichbare, jedoch mit Rücksicht auf die optimale Empfindlichkeit möglichst stark differierende MTk besitzen. Ist jedoch eine Komponente eines solchen Gemisches mit der Testflüssigkeit auch bei

* Wir verstehen unter MTk die *obere* kritische Mischungstemperatur, wenn nicht eigens die *untere* MTk erwähnt wird.

hohen Temperaturen völlig unmischbar und (oder) die zweite besonders leicht mischbar, so tritt Volumsabhängigkeit auf oder es scheidet sich die unlösliche Komponente allein aus. Im günstigsten Falle läßt sich unter solchen Umständen die Bestimmung innerhalb eines bescheidenen Prozentsatzes von 0 bis 15% oder von 85 bis 100% durchführen. Siehe hierzu die Äthanolbestimmung mit Paraffinöl bei *Fischer* und *Karasek*[1] und die Erläuterungen der Analyse von Salzlösungen im zweiten Teil dieser Mitteilung.

Zunächst seien einige prinzipielle Versuche erörtert, die dartun sollen, daß man bei der Mikrobestimmung der MTk immer das Temperaturmaximum der Mischungslücken-Diagramme erhält.

In einer genügend engen Kapillare erfolgt die Mischung bei Erreichen der MTk in einer wenige Zehntelmillimeter messenden Zone, der Großteil der beiden Flüssigkeiten bleibt also am Vorgang unbeteiligt. Daß sich beim Mikroverfahren immer das Maximum einstellt, ist offenbar darauf zurückzuführen, daß sich in der Mischungszone (bei bzw. knapp oberhalb der MTk) eine der Temperatur entsprechende gegenseitige Sättigung bzw. ein konstantes Gefälle von 0 bis 100% der Flüssigkeit A und gegenläufig dazu von 100 bis 0% der Flüssigkeit B findet. Beim Abkühlen auf die MTk tritt an der dem prozentuellen kritischen Mischungsverhältnis (z. B. 70% Glykol und 30% Acetophenon) entsprechenden Stelle bei der höchstmöglichen Entmischungstemperatur der Meniskus auf. Die hier abgelesene Temperatur, in diesem Fall 58,4° C, ist die MTk. Beim Wiedererwärmen nach erfolgter Entmischung wird der Meniskus bei dem erwähnten Prozentsatz am längsten erhalten bleiben, um dann bei der MTk zu verschwinden. Die höchstmögliche Mischungstemperatur stellt sich ein, sobald vollkommene Löslichkeit in jedem Verhältnis möglich ist. Dieser Vorgang kann durch Färbung der beiden Komponenten — Acetophenon mit Sudan III, Glykol mit Methylenblau — sichtbar gemacht werden. Oberhalb der MTk beobachtet man in der Mischungszone einen gleitenden Übergang der Farbtöne von Rot über Violett nach Blau. Beim Abkühlen erscheint der Meniskus im blauvioletten Anteil der Zone, also näher beim Glykol, entsprechend dem Volumsverhältnis 70% Glykol. Es wurden auch einige Mischungslückendiagramme nach dem Makroverfahren aufgestellt, um sie mit dem Mikroverfahren vergleichen und die kritischen Volumina (70:30) bestimmen zu können. Zu diesem Zweck schmelzten wir in Glasröhrchen von 1 cm Dicke und 5 bis 6 cm Länge genau gemessene Mengen der beiden Komponenten ein, wenn hohe MTk-Werte zu erwarten waren. Die Röhrchen, befestigt an einem Halter aus Blech, erhitzten wir unter fortwährendem Schütteln im Paraffinbad. Infolge des langsamen Temperaturaustausches muß sehr langsam erhitzt bzw. abgekühlt werden, um reproduzierbare Werte zu erhalten.

Liegt die MTk unter 70°, so verwendet man die üblichen Probegläser von 2,5 cm Durchmesser mit durchbohrtem Stopfen für Thermometer und Rührer, wie sie für die Anilinpunktbestimmung Verwendung finden (*Holde*[4]). Damit prüften wir die MTk des Systems Phenol:Wasser nach, da in der Literatur verschiedene Werte angegeben sind: z. B. *Lehfeldt*[5]: 70°, *Rothmund*[6]: 68°, *Schreinemakers*[7]: 67°, *Alexejew*[8], *Friedländer*[9]: 66°, *Timmermans*[10]: 65,3°, *Smith*[11]: 65,5°, *D'Ans* und *Lax*[12]: 65,3°. Die Makrobestimmung mit 36% Phenol (reinst, Fp. 40,7°, $n_D^{40,7} = 1.5424$) ergab 65,6°. Denselben Wert ergab auch die Mikrobestimmung. Der von *Fischer* und *Karasek*[2] seinerzeit angegebene Wert von 68.5° konnte als durch verunreinigtes Phenol verursacht erkannt werden. Auch das von *Eucken*[13] angeführte Diagramm läßt einen zu hohen Wert ($\approx 68°$) für das Maximum erkennen.

In diesem Zusammenhang sei auch der Anilinpunkt von Kraftstoffen erwähnt[4,14,15] der über den Aromaten- und Naphthengehalt sowie über die Zündwilligkeit Aufschluß gibt. Bei der Bestimmung dieser Kennzahl finden bekanntlich gleiche Volumteile Benzin und Anilin Verwendung. Wir haben den Anilinpunkt für ein Fahrbenzin mit 46,2° bestimmt. Die Aufstellung einer Kurve nach dem Makroverfahren ergab das Maximum von 46,7° bei 43% Benzin. Nach dem Mikroverfahren wurde für die MTk ebenfalls 46,7° gefunden. Die Kurve verläuft im Maximum nicht so flach wie die Phenolkurve. Es werden sich daher zwischen dem Anilinpunkt und der eigentlichen MTk immer gewisse Differenzen ergeben! Von drei weiteren Benzinen wurden lediglich Anilinpunkte und die MTk verglichen; letztere war, wie zu erwarten, höher, im Durchschnitt um 0,7°. Ein ähnliches Resultat ergab der Vergleich der Anilinpunkte mit der MTk von Nonan und Dekan: die Differenzen betrugen 0.6 bis 0.8°.

Da es sich bei Benzinen um Vielgemische — nicht mehr um binäre — handelt und die Möglichkeit besteht, daß geringe Mengen besonders leicht löslicher Bestandteile bereits bei niederer Temperatur in das Anilin diffundieren, ist es zweckmäßig, enge Kapillaren (0,2 bis 0,3 mm Durchmesser) zu verwenden, um an der kleinen Berührungsfläche die Diffusion möglichst gering zu halten.

Da die Mikrobestimmung sehr gut reproduzierbare Werte liefert, wäre es reizvoll, an Stelle von Anilin eine Testsubstanz zu finden, die gegenüber den Aromaten oder Naphthenen usw. eine größere MTk-Differenz ergibt, wobei eine etwas höhere MTk mit Rücksicht auf die verschlossene Kapillare keinen Nachteil bedeutet. Äthylenchlorhydrin zeigt Werte zwischen 80 und 90°, jedoch keine höhere Differenz als Anilin. Besser geeignet scheinen Dipropylenglykol (I) und Propionitril (II) zur Prüfung von Mineralölen zu sein. II spricht auf Aromaten stärker an als I, während Naphthene und Paraffine sich gegenüber I und II ähnlich verhalten. Bei den Benzinen erwies sich I und Acetonitril brauchbar.

wobei letzteres sich wie II bei den Ölen verhielt (II ist mit Benzinen mischbar). Auch Dimethylformamid scheint brauchbar zu sein. Für niedrig siedende Fraktionen ist u. a. Furfurol, Nitrotoluol, o-Toluidin und Nitrobenzol verwendet worden (Makromethode!). Diesbezügliche Versuche laufen.

1. Die Prüfung fetter Öle.

Der von *Valenta*[16] mit einer Eisessiglösung durch Zusatz von Wasser ermittelte Trübungspunkt wurde von *Crismer*[17] unter Verwendung von Alkohol (94,2 Vol.-%) zu einer Kennzahl ausgearbeitet. Die Volumina der Komponenten wurden nicht genau gemessen, so daß bereits *Asbóth*[18] von unsicheren Ergebnissen berichtet. Butterfett wird von *Weiss*[19] mit Äther-Alkohol-Gemischen und von *Crismer*[17] mit konz. Alkohol geprüft. *Jamieson*[20] beschäftigt sich eingehend mit diesem Problem, erwähnt die Eichung des Äthanols mit Olivenöl und empfiehlt Äthanol-Amylalkohol-Gemische. Die Messung der Komponenten erfolgt — wenig genau — durch Strichmarken in Eprouvetten. Abgesehen von mangelhafter Volumenmessung spielen auch Verdunstungsverluste von Alkohol während der Bestimmung im offenen Rohr nach der Vorschrift von *Holde*[4] eine Rolle. Es überrascht daher, wenn *Crismer*[17] und *Rothmund*[6] bemerken, daß es bei der Untersuchung der Butter keinen merklichen Unterschied macht, ob das gleiche oder doppelte (!) Volumen Alkohol zur Anwendung kommt. *Großfeld*, *Böhmer*, *Juckenack*[21] weisen auf die beträchtlichen Schwankungen der Werte und die Umständlichkeit der Bestimmung hin.

Die Mikrobestimmung der MTk bringt eine wesentliche Vereinfachung und vermeidet Ungenauigkeiten, die Auffindung von Äthylenchlorhydrin als Test erhöht die Empfindlichkeit der Bestimmung.

Daten der Testsubstanzen:

Äthylenchlorhydrin: Kp. 128°, $n_D^{20} = 1{,}4409$. Nach Fraktionierung unter dichtem Verschluß (hygroskopisch!) lange haltbar und weniger flüchtig als

Äthanol: 96,4 Vol.-% (15° C). Dieses ist gegenüber dem von *Crismer*[17] verwendeten, nur 94,2 vol.-%igen, wegen des geringeren Wassergehaltes zweckmäßiger.

In Tabelle 1 sind die mit beiden Testflüssigkeiten für 17 Öle festgestellten kritischen Mischungstemperaturen angeführt. Mit deren Hilfe kann eine Identifizierung in den meisten Fällen erfolgen.

Im Anschluß an die Messung der in Tabelle 1 angeführten Temperaturen wurden noch mehrere Proben dieser Öle verschiedener Provenienz geprüft, um die Konstanz der MTk-Werte bei den einzelnen Ölen unter Beweis zu stellen. Sechs verschiedene Olivenölproben [italienisches, amerikanisches, DAB VI und interessanterweise auch zwei Öle aus norwegischen und portugiesischen Ölsardinen (!) und ein Öl unbekannter Herkunft]

zeigten mit Äthylenchlorhydrin einen Durchschnittswert von 80°, wobei nur Abweichungen von ± 0,3° beobachtet werden konnten. Vom Sesamöl ergab eine amerikanische und eine DAB-VI-Sorte völlig identische Werte. Zwei Cacaobutter-Sorten zeigten eine innerhalb der Fehlergrenze liegende Abweichung von ± 0,1°. Beim Leinöl (vier Sorten) sind die Schwankungen etwas größer (± 2°), da Zeitpunkt der Ernte und Dauer der Lagerung mit Rücksicht auf die ungesättigten Glyceride zweifellos von Einfluß sind. Das gleiche gilt für vier Proben Kürbiskernöl (± 0,9°).

Tabelle 1.

Ölsorte	MTk in °C mit der Testsubstanz	
	Äthanol, 96,4 Vol.-%	Äthylenchlorhydrin
Leinöl	101,6	37,0
Crotonöl	83,9	unter 20
Palmöl	88,1	55,2
Sonnenblumenöl	106,2	62,1
Kürbiskernöl	109,6	62,6
Maisöl	103,6	64,1
Baumwollsamenöl	103,6	65,5
Lebertran DAB VI	106,6	65,6
Sesamöl	106,8	69,6
Pfirsichkernöl	107,2	73,2
Olivenöl	108,8	80,3
Erdnußöl	109,9	78,1
Rüböl	118,2	89,6
Ripsöl	120,2	91,1
Cacaobutter	113,8	94,6

Rizinusöl ergibt mit Hexadekan ($n_D^{20} = 1{,}4356$) eine MTk von 71,6 .

Ölsäure läßt sich in Ölen bis zu einem Gehalt von 10% bestimmen. Die Empfindlichkeit ist allerdings nicht groß. 1° Temperaturdifferenz entspricht 0,7% bei Olivenöl und 1% bei Sesamöl. Zwei Öle wurden mit Äthylenchlorhydrin und mit Äthanol als Testflüssigkeit geprüft: letzteres weist eine geringere Empfindlichkeit auf: 1° Temperaturdifferenz entspricht 0,9% bzw. 1,1%. Die Bestimmung ist also nicht sehr genau, wenn man berücksichtigt, daß nach *Fischer*[22] 2,26% freie Säure einem Säuregrad von 8 entsprechen.

	Ölsäurezusatz in Gew.-%			
	0	2	5	10
MTk bei Olivenöl	80,3 (108,8)	76,6 (107,3)	72,6 (103,9)	66,0 (97,6)
MTk bei Sesamöl	69,6 (106,8)	67,2 (105,6)	65,0 (102,6)	59,6 (97,9)

Die eingeklammerten Werte wurden mit Äthanol als Testflüssigkeit erhalten.

Linolsäure und Fettsäuren mit konjugierter Doppelbindung zeigen keine größere MTk-Differenz als Ölsäure. Aus dieser Tabelle lassen sich — so wie aus allen folgenden — mehr oder weniger steil ansteigende Kurven zeichnen, wobei die einzelnen Kurvenpunkte die jeweiligen Maxima der Mischungslückendiagramme, entsprechend einem bestimmten Prozentsatz (hier der zugemischten Ölsäure) darstellen. Der Typus des Diagramms entspricht bei den Ölen dem des Systems Phenol:Wasser.

Nach *Großfeld*[23] wird immer wieder versucht, Speiseöle durch Zusatz von Paraffinöl zu strecken. Dieser Autor bezeichnet die hierfür vorliegenden Untersuchungsverfahren als umständlich und wenig empfindlich. Ähnlich äußert sich *Patzsch*[24]. Schnellteste erwähnt u. a. *Mendritzki*[25].

Mit Äthylenchlorhydrin ist eine einfache Bestimmung des Paraffinölzusatzes möglich. Wir haben zu diesem Zweck eine Anzahl von Paraffinölsorten hinsichtlich der Streuung der MTk geprüft. Es ergab sich ein Wert von 159 $\pm$ 2°, meist etwa 160°, so daß 1° Temperaturdifferenz (Δt) im Durchschnitt etwa 1% Paraffinöl entspricht. Die Tabelle 2 zeigt die erhaltenen Werte von acht geprüften Ölen.

Tabelle 2. Testflüssigkeit: Äthylenchlorhydrin.

	% Paraffinöl									% pro 1° Δt
	0	10	20	30	40	50	60	80	100	
MTk mit Sesamöl .	69,2		93,4		118,0	127,8	136,9	148,6	160	1,1
MTk mit Kürbiskernöl . . .	62,6	82,3		110,6		128,1	136,5	150,0	160,6	1,0
MTk mit Leinöl . . .	37,0	65,3		112,3	121,3	126,6	133,1	146,9	160,9	0,7
MTk mit Sonnenblumenöl.	62,1	78,0		105,6		133,6	133,9	148,1	160,0	1,0
MTk mit Erdnußöl	78,1	87,8		109,9		128,6	136,1	149,0	160,6	1,2
MTk mit Olivenöl .	80,3		99,3		117,6	126,0		145,2	159,6	1,2
MTk mit Ripsöl . . .	91,1	100,2		117,9		133,6	138,6	150,1	160,6	1,4

Mit Alkohol als Testflüssigkeit werden viel flachere und daher für die Bestimmung weniger geeignete Kurven erhalten (Abb. 1). Erwähnenswert ist, daß die Empfindlichkeit für Leinöl und Kürbiskernöl bei Zusätzen von 0 bis 30% Paraffinöl größer ist und 0,4% bzw. 0,62% pro 1° Δt beträgt, da die Kurve steiler ansteigt, bei etwa 50% Paraffinölzusatz einen Knick aufweist und von da aus flacher verläuft.

Auch Gemische von Ölen untereinander lassen sich annähernd bestimmen: z. B. Ripsöl in Kürbiskernöl. Äthylenchlorhydrin wird als Testflüssigkeit verwendet; $1° \Delta t$ entspricht 3,5% Ripsöl.

	% Ripsöl					
	0	20	40	60	80	100
MTk mit Kürbiskernöl	62,8°	68,6°	76,6°	82,7°	86,6°	91,1°

Für pharmazeutische Zwecke von Bedeutung ist die Schnellanalyse von Chloroform in Erdnußöl mit Äthylenchlorhydrin als Testflüssigkeit. $1° \Delta t$ entspricht 1,3% Chloroform.

	% Chloroform								
	0	10	20	35	45	50	60	65	70
MTk mit Erdnußöl ..	78,1°	75°	70,1°	60,2°	50,1°	44,9°	32,6°	26,4°	20,2°

Bei Prozentzahlen über 70% wäre ein Kühltisch[26] oder wenigstens eine von Wasser oder Kältemischung durchflossene Dose, zu verwenden. So hohe Werte kommen jedoch in der Praxis nicht vor.

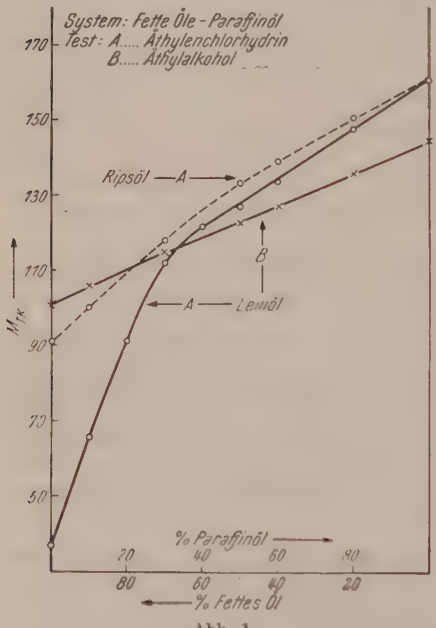


Abb. 1.

Über die Bestimmung des Kampfers in Kampferöl wird an anderer Stelle berichtet, ebenso über die schon von *Voorst*[27] geprüfte Beziehung zwischen Jodzahl und MTk, die mit neuen Testsubstanzen auf breiterer Basis untersucht werden konnte.

2. Die Analyse wäßriger Salzlösungen.

Wäßrige Lösungen von Chlorwasserstoff, Ammoniak und Wasserstoffperoxyd wurden bereits von *Fischer* und *Neupauer*[2] quantitativ geprüft. Über die Beeinflussung binärer Systeme durch Zusatz von Salzen, die in einer Komponente gut, in der anderen sehr schlecht löslich sind, liegen Untersuchungen von *Timmermans*[10] vor. Aus einem Mischungslücken-Diagramm von Phenol mit Kochsalzlösung ist ersichtlich, daß

sich das Maximum bei Werten um 8 bis 10% Natriumchlorid gegen 80% Phenol verschiebt (gegenüber 36% bei reinem Wasser), so daß die Kurve eine ganz andere Form erhält. Infolge der Umständlichkeit der Makromethode — es wäre auch, abgesehen von der höheren Temperatur, unangebracht, hier so wie beim Anilinpunkt mit einem Gemisch 1:1 zu arbeiten — sieht *Timmermans* von dem Vorschlag ab, die Methode zur Analyse von Salzlösungen praktisch anzuwenden. Mit Hilfe der Mikromethode, bei der man immer das Maximum des Mischungslücken-Diagramms erhält, gelingt es mit Phenol als Testsubstanz, die Konzentration von Salzlösungen mit zufriedenstellender Genauigkeit zu bestimmen, da die anorganischen Salze in allen Fällen die MTk stark erhöhen. Prozentgehalte über 20% können geprüft werden, sofern sich von dem betreffenden Salz überhaupt so hohe Konzentrationen herstellen lassen. Der Temperaturanstieg beträgt etwa 50 bis 60°, so daß eine befriedigende Genauigkeit gewährleistet ist. Versuche, das Phenol, das sich wegen der nicht zu hohen maximalen Temperaturen — bis etwa 137° — gut eignet, etwa durch Butanol, Amylalkohol, Kresole, Anilin usw. zu ersetzen, verliefen nicht erfolgreich, da bei den ziemlich hohen Temperaturen Zerreißungen der Säule — offenbar infolge Zersetzung — vorkommen, die eine Ablesung verhindern. Außerdem kann Volumsabhängigkeit und Gleichheit des Brechungsindex auftreten[1].

Zur Methodik sei noch folgendes vorausgeschickt: Im Gegensatz zum System Phenol : reines Wasser beobachtet man bei steigenden Salzkonzentrationen eine Verbreitung der Mischungszone auf mehrere Millimeter und damit im Zusammenhang ein Wandern des Meniskus in die Salzlösung hinein; die Kapillare muß daher unter dem Objektiv verschoben werden. Daher ist es nötig, von den beiden Komponenten mehr in die Kapillare einzufüllen, als es sonst bei der Mikrobestimmung der MTk üblich ist. Salzlösung wird bis zu einer Länge von etwa 10 bis 14 mm, Phenol bis zu etwa 6 bis 8 mm Länge eingefüllt, auf jeden Fall aber so viel, daß bei Erreichen der MTk außer der Mischungszone noch jeweils ein Teil der ungemischten Komponenten an beiden Enden der Säule erhalten bleibt. Grundbedingung ist, daß sich ein prozentuelles Gefälle zwischen Salzlösung und Phenol ausbilden kann, in dem dann das dem Maximum des Mischungslücken-Diagramms entsprechende Verhältnis von Lösung und Testflüssigkeit vorliegt.

Beim Füllen der Kapillare läßt man zweckmäßig zuerst die Salzlösung und dann das Phenol aufsteigen und vermeidet damit, die mit Salzlösung benetzte Kapillare abschmelzen zu müssen, wodurch Fehler durch Salzreste auftreten können. Beim Phenol spielt das keine Rolle. Ferner ist beim Zentrifugieren zu beachten, daß mehr als etwa 7%ige Salzlösungen spezifisch schwerer sind als das Phenol. Man wird daher in diesem Falle die Kapillare mit der Salzlösung nach unten zentrifugieren,

während sonst bei niedriger Salzkonzentration das Phenol sich unten befindet. Es ist nämlich zu vermeiden, daß vor der Bestimmung der MTk die beiden Flüssigkeiten durch verkehrtes Zentrifugieren aneinander vorbeifließen und sich gegenseitig zu stark austauschen.

In diesem Zusammenhang sei auf ein Phänomen aufmerksam gemacht. das bei höheren Salzkonzentrationen (über 5 bis 7%) zu beobachten ist. Nach dem Einfüllen des Phenols oder während des Erhitzens entstehen in der Phenolsäule mehrere sekundäre Menisken bzw. kurze Teilchen wäßriger Flüssigkeit, die eine höhere MTk zeigen als der *allein* für die Bestimmung *ausschlaggebende Hauptmeniskus* an der Grenze des Phenols und der Salzlösung. Dieser ist vom Phenol aus gesehen konvex. Für diese Erscheinung läßt sich folgende Erklärung geben: Beim Einströmen der Salzlösung bleibt an der Kapillarinnenwand ein Rest als dünner Film zurück, diesem entzieht das nachströmende Phenol — wie im folgenden gezeigt wird — Wasser, wodurch die Salzlösung konzentrierter wird und sich von der Wand her abscheidet, wobei sie die Phenolsäule an einigen (2 bis 4) Stellen einschnürt bzw. die Phenolsäule unterbricht. Dadurch entstehen sekundäre Menisken. Bei niedrigen Salzkonzentrationen oder Wasser löst sich dieser Film glatt in Phenol auf und es zeigen sich daher keine Abscheidungen oder sekundäre Menisken. Für die Bestimmung der MTk allein ausschlaggebend ist der konvexe Meniskus an der Grenze der Salzlösung und der Phenolsäule. Sekundäre Menisken im Phenol sind abwechselnd konkav oder konvex und zeigen eine höhere (unrichtige) MTk, die nicht verwertet werden darf. Daß diese Erklärung richtig ist, konnte dadurch bewiesen werden, daß sogar eine 14%ige Zinksulfatlösung durch Schütteln mit Phenol auf eine Konzentration von 17,5% gebracht werden konnte. Diese bei Salzlösungen zu beobachtenden auffälligen Erscheinungen stehen offenbar mit der Tatsache im Zusammenhang, daß die Salze wohl in Wasser gut, jedoch in Phenol sehr schwer löslich sind.

Ferner beobachtet man bei konz. Salzlösungen (gegen 20%) die sogenannte Mischungsträgheit. So verschwindet nämlich der Meniskus bei normalem Erhitzen — 4° pro Minute — um einige Grade höher, als er beim Abkühlen wieder erscheint. Verweilt man jedoch in einem zweiten Versuch einige Zeit bei der beim Abkühlen gefundenen MTk — bzw. etwa 1° darüber —, dann verschwindet der Meniskus nach einigen Minuten.

Bei hochprozentigen Salzlösungen kann es unter Umständen zum Auskristallisieren des Salzes kommen. Wenn dies außerhalb der Mischungszone stattfindet, ist es kaum von Bedeutung. Innerhalb der Zone eintretendes Auskristallisieren kann natürlich Fehler mit sich bringen.

Wir haben 33 Salze bzw. deren Lösungen, wie sie im DAB VI und in der Pharmacopoea Helvetica angegeben sind, gegen Phenol als Testflüssigkeit geprüft. Außerdem wurden zwei Lösungen gegen p-Kresol

untersucht. Je nach der Löslichkeit der Salze wurden im allgemeinen sieben verschiedene Konzentrationen zur Bestimmung der MTk verwendet. Die erhaltenen Werte sind in Tabelle 3 zusammengestellt. Die Abb. 2 gibt für Natriumchlorid und Kaliumnitrat die aus den Messungen der MTk ermittelten Kurven sowie das Verhältnis zwischen Prozentgehalt und Brechungsindex wieder. Der steile Anstieg im Beginn der MTk-Kurven zeigt, daß bei Konzentrationen zwischen 0 und 1% die Empfindlichkeit größer ist als im späteren Kurvenverlauf, also auch größer als die in der Tabelle angegebene durchschnittliche Empfindlichkeit. In diesem Konzentrationsintervall von 0 bis 1% entsprechen Differenzen der MTk von 1° C folgende Konzentrationsunterschiede: für Ammoniumsulfat und Natriumchlorid: 0,09%; für Natriumsulfat und Calciumchlorid: 0,1%; für Natriumphosphat und Kaliumsulfat: 0,11%.

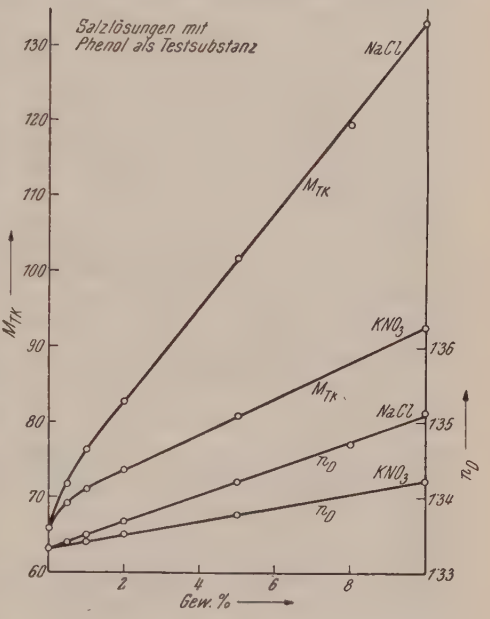


Abb. 2.

Der steile Anstieg am Anfang der Kurven und ihre verschiedene Neigung ist möglicherweise auf die unterschiedliche Abnahme der beiden Aktivitätskoeffizienten bei steigender Salzkonzentration zurückzuführen (s. Abb. 2).

In der letzten Rubrik der Tabelle 3 ist zum Vergleich die 1% entsprechende Änderung des Brechungsindex (Δn_D) angeführt. Die Empfindlichkeit ist hier meist geringer. In diesem Zusammenhang sei jedoch auf das Mikroverfahren mit Hilfe von Glaspulvern nach *Fischer* und *Kocher*[28] hingewiesen.

Untersuchungen über die Relation der MTk von Salzen zu deren Löslichkeit und Dissoziation haben *Timmermans*[10], *Cernatescu*[29] und *Rothmund*[6] ausgeführt. Der letztgenannte Autor zeigt Löslichkeitskurven von Salzen (NaCl, KCl, K_2SO_4) mit geringer bzw. sehr geringer Löslichkeitszunahme bei steigender Temperatur (Gruppe I) und von solchen (KNO_3, $NaNO_3$, $K_2Cr_2O_7$) mit großer Löslichkeitszunahme beim Erwärmen (Gruppe II). Die MTk-Kurven der Gruppe I verlaufen jedoch viel steiler als die der Gruppe II. Ein Salz bewirkt demnach eine um so stärkere Erhöhung der MTk, je geringer der Anstieg seiner Löslichkeit mit der Temperatur ist.

Tabelle 3 (Salzlösungen).
Testsubstanz: *Phenol* puriss. MTk mit reinem Wasser = 65,6°.

Verwendetes Salz	MTk in °C bei einer Salzlösung von							Δ% für 1° Mittelwert	Δn_D für 1%
	0,5%	1%	2%	5%	10%	15%	20%		
Ammoniumchlorid	71,3	75,1	81,7	95,4	117,1	138,0		0,2	0,0019
Ammoniummolybdat	69,5	71,4	73,1	78,3	87,6			0,4	0,0013
Ammoniumphosphat	70,1	73,9	78,3	90,6	109,3	128,3		0,17	0,0018
Ammoniumsulfat	73,1	76,4	81,1	96,1	121,1			0,18	0,0013
Bariumchlorid	70,3	73,2	76,1	86,1	103,1	120,6		0,2	0,0012
Bariumnitrat	69,1	70,6	73,6	80,4	[1]			0,4	0,0008
Calciumchlorid	72,1	76,1	87,1	105,1		142,1		0,2	0,0011
Cadmiumsulfat	70,6	72,1	75,7	84,4	98,1	110,7		0,3	0,0012
Kaliumbichromat	68,1	68,9	69,9	74,5	85,6			0,5	0,0019
Kaliumbromid	69,3	71,6	75,1	83,6	97,4	111,1	124,4	0,3	0,0013
Kaliumchlorid	71,8	75,8	79,9	92,3	113,6			0,2	0,0013
Kaliumjodid	67,1	68,6	73,1	76,1	82,6	89,1	96,1	0,6	0,0019
Seignettesalz	69,9	72,9	77,0	86,1	100,8	116,1	130,6	0,3	0,0011
Kaliumtartrat	70,3	73,5	77,5	88,4	105,3	122,7	139,0	0,27	0,0014
Kaliumferricyanid	72,1	74,9	78,6	90,6	111,1			0,2	0,0015
Kaliumferrocyanid	71,3	74,1	78,2	89,1	109,2	128,5		0,2	0,0018
Kaliumnitrat	69,1	71,1	73,6	81,0	92,6	104,1		0,4	0,0009
Kaliumphosphat prim.	71,6	74,1	77,9	89,1	109,1			0,2	0,0011
Kaliumphosphat sec.	69,6	72,5	75,8	85,6	101,9	134,9		0,3	0,0015
Kaliumzitrat	71,1	73,6	77,6	88,1	105,1	138,3		0,3	0,0015
Kaliumsulfat	71,8	74,6	79,5	92,5	114,0			0,2	0,0011
Magnesiumsulfat	68,8	70,6	73,6	82,6	99,6	116,1	133,1	0,3	0,0009
Natriumhydrogenkarbonat	68,6	71,1	75,6	89,1	[2]			0,2	
Natriumchlorid	71,7	76,3	82,6	101,7	133,1			0,15	0,0018
Na-glycerophosphat[3]	68,6	70,3	73,6	79,6	89,1	100,1	109,8	0,4	0,0011
Natriumjodid[4]	68,6	70,0	72,2	77,8	86,1		102,9	0,5	0,0014

Natriumphosphat prim.	71,6	74,5	79,6	92,6	113,1	134,1		0,2	0,0011
Natriumphosphat sec.	69,0	71,1	74,1	84,4	[5]			0,3	0,0010
Natriumsulfat	72,1	75,1	80,2	93,1	113,8			0,2	0,0011
Natriumsulfit	67,6	70,0	72,6	80,3	93,2	106,1		0,4	0,0007
Natriumtartrat	70,1	73,0	77,6	89,6	105,7	124,1	141,7	0,3	0,0014
Natriumzitrat	69,9	73,8	77,9	89,6	104,1	149,6		0,3	0,0015
Weinsäure[6]	68,1	69,1	70,3		74,6		80,6	1,5	0,0014
Zinksulfat	70,7	73,0	77,1	83,8	96,1	107,9		0,3	0,0010

Testsubstanz: *p-Cresol*. MTk mit Wasser = 143°.

Natriumsalicylat	141,3	139,5	135,6	116,8				0,2	0,0016
Resorcin	142,1	140,2	137,5	125,6	102,8			0,2	0,0019

[1] 8%: 87,1°; [2] 8%: 102,1°; [3] 30%: 129°, 40%: 154,1°; [4] 30%: 120°; [5] 7%: 90,6°; [6] 30%: 85,5°, 40%: 91,6°.

Schließlich seien noch α- und β-Picolin als zwei Substanzen mit vollständiger Mischungslücke — analog dem Gemisch Nicotin:Wasser — mit oberer und unterer MTk erwähnt. Wir haben nach dem Makroverfahren ein Diagramm für das System β-Picolin:Wasser aufgestellt und gefunden, daß Natriumchloridlösungen die Mischungslücke vergrößern. Auch bei der Mikrobestimmung in der Kapillare gelingt es hier, beide Punkte, die untere MTk bei 51° und die obere MTk bei 146°, einwandfrei zu erhalten. Nur muß man beim Füllen der Kapillare eine zu weitgehende Durchmischung verhindern (Volumsabhängigkeit!), da die Flüssigkeiten bei Zimmertemperatur noch mischbar sind. Außerdem ist die Differenz der Dichten gering. Man läßt daher beim Aufsaugen zwischen beide Flüssigkeitssäulen eine Luftblase eintreten und zentrifugiert dann bei obenstehendem β-Picolin ($d = 0{,}95$). (Die Grenze gegenüber dem Wasser ist bereits makroskopisch infolge der großen Differenz der Brechungsindizes von 0,168 deutlich zu sehen.) Das Erscheinen (51°) und das Verschwinden des Meniskus (146°) ist gut zu beobachten. Die beiden MTk liegen auf derselben Abszisse, d. h. bei demselben Volumsverhältnis von 26% β-Picolin. Bei höherer Natriumchloridkonzentration (1,5%) verschiebt sich dieses bis gegen 50%, wobei die untere MTk auf 35° sinkt, die obere auf 175° ansteigt (β-Picolin: Kp. 143°, $n_D^{20} = 1{,}5012$).

α-Picolin hingegen weist mit reinem Wasser keine Mischungslücke auf, erst nach Zusatz von 0,4%

Natriumchlorid entsteht bei zirka 100° eine ganz kleine Mischungslücke, die durch Erhöhung der Natriumchloridkonzentration auf 0,5 bis 0,8% deutlich darstellbar ist (Abb. 3). Recht gut eignet sich ein Gemisch von 40% α-Picolin und 60% einer 0,5%igen Natriumchloridlösung, das man in ein Glasrohr von 1 bis 2 cm Durchmesser und 6 bis 10 cm Länge einschmilzt, für die einfache Demonstration einer vollständigen Mischungslücke. Man erhitzt in einem Ölbad oder Metallblock auf etwa 125° und schüttelt kurz, wobei man eine klare Lösung erhält. Bei geringem Abkühlen (auf 120 bis 121°) trübt sich die Lösung (Entmischung) und wird bei weiterem Abkühlen (bei 94°) wieder klar. Es wurde mit Absicht das Mischungsverhältnis 1:1,5 gewählt, da einerseits die Temperaturdifferenz für den Versuch besser etwas kleiner ist und außerdem bei geringem Überschreiten des Volumsverhältnisses 1:1 (d. h. degen 60% Picolin) die Kurve steil ansteigt und keine scharfe Grenze bei der Trübung und Klärung erhalten wird. In der Kapillare ist der Meniskus bei der oberen und unteren MTk erst ab 0,8% Natriumchlorid richtig ausgebildet. Unter 0,8% sind an der Grenzzone der Flüssigkeiten wohl kleine Bläschen sichtbar, es kommt aber offenbar infolge einer „Entmischungsträgheit" nicht zu einer deutlichen Meniskenbildung.

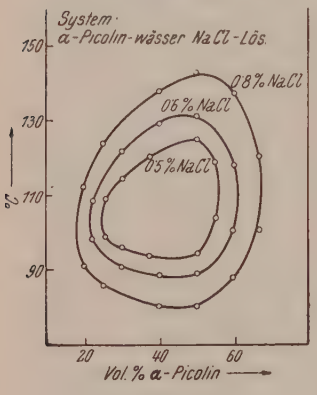


Abb. 3.

Zusammenfassung.

Einleitend wird an Hand einiger Beispiele erneut bewiesen, daß bei der einfach und rasch durchführbaren Mikrobestimmung der kritischen Mischungstemperatur (MTk) immer *die* Temperatur erhalten wird, die dem *Maximum* des Mischungslückendiagramms entspricht. Mit der neuen Testflüssigkeit Äthylenchlorhydrin wird die MTk als Kennzahl einiger fetter Öle bestimmt und die Konstanz der Werte bei verschiedener Provenienz der Öle sichergestellt. Mit der gleichen Testsubstanz werden Eichkurven für Gemische von Ölen mit Ölsäure und mit Paraffinöl aufgestellt. Auch Gemische von Kürbiskernöl und Ripsöl und das Chloroformöl können so geprüft werden. Weiters kann die MTk zur Konzentrationsbestimmung wäßriger Lösungen benützt werden. Meist handelt es sich hierbei um Lösungen anorganischer Salze (32); außerdem um Lösungen von drei organischen Verbindungen, die in Arzneibüchern angeführt sind. Von jedem dieser Salze wurde bei 6 bis 8 verschiedenen Konzentrationen mit Phenol als Testflüssigkeit die MTk gemessen. Aus diesen Zahlen kann jeweils eine Eichkurve erstellt werden. Über die bei den Salz-

lösungen zu beachtenden Vorsichtsmaßregeln wird eingehend berichtet. Die Genauigkeit der Bestimmung beträgt im Durchschnitt 0,3% pro 1° Temperaturdifferenz, in einzelnen Fällen sogar 0,09%. Die Dauer der Bestimmung beträgt 10 bis 15 Minuten. Schließlich wird noch die Beobachtung einer vollständigen Mischungslücke beim α-Picolin mit verd. Kochsalzlösung mitgeteilt.

Summary.

As an introduction, several examples were used to prove once more that in the simple and rapid microdetermination of the critical mixing temperature (MTk), the temperature is always obtained which corresponds to the *maximum* of the miscibility diagram. The MTk was determined as characteristic of several fatty oils by means of the new test liquid ethylene-chlorhydrin, and the constancy of the values established with oils of various origins. The same test substance was used to set up standard curves for mixtures of oils with oleic acid and with paraffin oil. Likewise mixtures of gourd seed oil with rape-seed oil and of peanut oil with chloroform can be tested in this way. Furthermore, the MTk can be used to determine the concentration of aqueous solutions. Usually, these were solutions of inorganic salts (32); in addition, solutions of three organic compounds given in the pharmacopoeias were also studied. Six to eight concentrations of each of these materials were used to determine the MTk with phenol as test liquid. The respective standard curves can be produced from the data obtained in this way. The precautions to be taken in the case of the salt solutions are discussed in detail. In general, the accuracy of the determination averages 0.3% per 1° temperature difference; in some cases 0.09% was attained. A determination requires 10–15 minutes. Finally a report is given of a complete miscibility gap in the case of α-picoline with dilute sodium chloride solution.

Résumé.

On démontre à l'aide de quelques expériences de nouveau que l'on peut toujours obtenir la température qui correspond au *maximum* du diagramme de miscibilité partielle, à l'aide d'une micro-estimation simple et rapide de la température critique du mélange (MTk). Avec le nouveau liquide d'essai, la monochlorhydrine du glycol, on estime la MTk comme indice de quelques huiles grasses et on établit la constance de la valeur pour des huiles de diverses provenances. Avec la même substance d'essai, on établit la courbe d'étalonnage pour des mélanges d'huiles avec l'acide oléique et avec l'huile de paraffine. On peut aussi examiner le mélange d'huile de grains de courge avec l'huile de colza et le mélange d'huile de glands de terre avec le chloroforme. On peut aussi utiliser la MTk pour estimer la concentration de solutions aqueuses. Pour la plupart (32), il s'agit de solutions de sels minéraux et de solutions de 3 composés organiques introduits dans les pharmacopées. Pour chacune de ces substances, on mesure pour 6 à 8 concentrations diverses en se servant du phénol comme liquide antagoniste. A partir des valeurs mesurées, on peut construire la courbe d'étalonnage. On indique les précautions à prendre pour le cas des solutions salines. L'exactitude de la méthode vaut en moyenne 0,3% pour une différence de température de 1° et 0,09% dans des cas isolés. La durée de l'estimation est de 10 à 15 minutes environ. Enfin, on indique encore l'observation d'une miscibilité partielle pour l'α-picoline avec une solution étendue de chlorure de sodium.

Literatur.

[1] *R. Fischer* und *G. Karasek*, Mikrochem. **33**, 316 (1947).

[2] *R. Fischer* und *E. Neupauer*, Mikrochem. **34**, 319 (1949).

[3] *R. Fischer* und *H. Resch*, Naturwiss. **39**, 404 (1952).

[4] *D. Holde*, Kohlenwasserstofföle und Fette. Berlin: J. Springer. 1933.

[5] *R. A. Lehfeldt*, Phil. Mag. **40**, 397 (1895); **46**, 42 (1898); zitiert nach *J. Timmermans*, Z. physik. Chem. **58**, 129 (1907).

[6] *V. Rothmund*, Löslichkeit und Löslichkeitsbeeinflussung. Leipzig. 1907.

[7] *F. A. H. Schreinemakers*, Z. physik. Chem. **23**, 417 (1897); **22**, 93, 515 (1897); **25**, 305, 534 (1897); **26**, 236 (1898); **27**, 95 (1898); **30**, 460 (1899); **33**, 74, 78 (1900).

[8] *W. Alexejew*, Ann. Phys. **28**, 305 (1886); zitiert nach *J. Timmermans*, l. c.

[9] Zitiert nach *J. Timmermans*, l. c.

[10] *J. Timmermans*, Z. physik. Chem. **58**, 129 (1907).

[11] *R. A. Smith*, Mikrochem. **11**, 227 (1932).

[12] *J. D'Ans* und *E. Lax*, Taschenbuch für Chemiker und Physiker. Berlin: Springer-Verlag. 1951.

[13] *A. Eucken*, Lehrbuch der chemischen Physik. S. 322. Leipzig: Akadem. Verlagsges. 1932.

[14] *F. Jantsch*, Kraftstoffhandbuch. Stuttgart: Frank'sche Verlagsbuchh. 1949.

[15] *N. Sachanen*, The Chemical Constitution of Petroleum. New York: Reinhold. 1945.

[16] *E. Valenta*, Dinglers Polytechn. J. **252**, 296; **253**, 418 (1884); zitiert nach *A. Juckenack*, Handbuch der Lebensmittelchemie, 4. Bd., S. 49. Berlin: J. Springer. 1939.

[17] *L. Crismer*, Association Belge des Chimistes, **1895**, Nr. 1; zitiert nach Chem. Zbl. **1895** II, 1059; Bull. assoc. Belge des Chimistes, **10**, Nr. 8 und 12; zitiert nach Chem. Zbl. **1897** I, 1254 und 1255.

[18] *A. v. Asbóth*, Chem.-Ztg. **20**, 685; zitiert nach Chem. Zbl. **1896** II, 717.

[19] *Weiss*, Milch-Ztg. **25**, 221, 243; zitiert nach Chem. Zbl. **1896** II, 71.

[20] *S. Jamieson*, Vegetable Fats and Oils. S. 383. New York: Reinhold. 1943.

[21] *A. Juckenack*, Handbuch der Lebensmittelchemie. 4. Bd., S. 49. Berlin: J. Springer. 1939.

[22] *B. Fischer*, Lehrbuch der Chemie für Pharmazeuten. Stuttgart: F. Enke 1938.

[23] *J. Großfeld*, Z. Unters. Lebensmittel **72**, 422 (1936).

[24] *H. Patzsch*, Pharmaz. Zentralhalle **89**, 9 (1950).

[25] *P. Mendritzki*, Süddtsch. Apoth.-Ztg. **89**, 973 (1949); zitiert nach Fette u. Seifen **53**, 293 (1951).

[26] *L., A.* und *W. Kofler*, Mikrochem. **38**, 218 (1951).

[27] *Th. van Voorst*, Chem. Weekbl. **46**, 150 (1950); **47**, 333 (1951); zitiert nach Fette u. Seifen **52**, 9 (1950); **53**, 567 (1951).

[28] *R. Fischer* und *G. Kocher*, Mikrochem. **32**, 173 (1944).

[29] *R. Cernatescu*, Z. physikal. Chem. **133**, 31 (1928).

Aus dem Physikalischen Institut der Universität Innsbruck.

Studien zur Schmelzpunktsbestimmung nach der für den Koflerschen Mikroheiztisch modifizierten Kapillarmethode von Rast.

Von

Othmar Rizzolli.

Mit 5 Abbildungen.

(Eingelangt am 20. Juli 1953.)

Problemstellung.

Unter den mikrochemischen Untersuchungsmethoden hat in den letzten Jahren die Bestimmung des Schmelzpunktes und der Gefrierpunktserniedrigung unter dem Mikroskop zur Identifizierung und Molekulargewichtsbestimmung organischer Substanzen eine besondere Bedeutung erlangt.

Die Gefrierpunktserniedrigung wurde schon vor einigen Jahrzehnten von *Van 't Hoff*[1], *Raoult*[2], *Beckmann*[3] sowohl theoretisch als auch experimentell untersucht. Später waren es vor allem *Eykmann*[4], *Auwers*[5], *Kremann*[6], *Rast*[7], *Hückel*[8] u. v. a., die sich damit beschäftigten und eine ganze Reihe von Substanzen und Gemischen untersuchten.

Es wurden auch verschiedene Meßvorrichtungen bzw. Meßmethoden angegeben, so z. B. die von *Beckmann*[3] und *Rast*[7]. Letzterer entwickelte die Kapillarmethode, die im folgenden näher behandelt wird. Eine immer weitere Verbreitung finden die Heizbank und der Mikroheiztisch von *Kofler*. Während man mit dem ersteren Gerät keine allzu große Genauigkeit erzielt — sein Vorteil liegt vor allem in der Einfachheit der Handhabung und damit in der sehr wesentlichen Zeitersparnis — läßt der Mikroheiztisch ohne weiteres exaktere Messungen zu. Der Vorteil dieses Gerätes liegt nicht nur in der einfachen Handhabung, sondern vor allem darin, daß der Schmelzvorgang mit dem Mikroskop beobachtet werden kann.

Der Anstoß zu vorliegenden Studien wurde durch die Erfahrung gegeben, daß verschiedene Methoden für den Schmelzpunkt ein und

derselben Substanz bisweilen Werte lieferten, die oft ganz beträchtlich voneinander abwichen. Es galt nun zu untersuchen, ob die Ursache dieser Abweichungen in der verschieden großen Genauigkeit der einzelnen Methoden gelegen ist.

Für die Untersuchungen wurde ein Mikroheiztisch[9] normaler Ausführung verwendet. Die Temperatur wird bei einem solchen mit einem Quecksilberthermometer gemessen, das mit einer Einteilung in ganze Grade versehen ist. Halbe Grade müssen bereits geschätzt werden. Um nun große Genauigkeiten zu erzielen, verwendet man bei der Bestimmung der Gefrierpunktserniedrigung Lösungsmittel, die möglichst große Depression aufweisen (z. B. Campher). Der Nachteil nahezu aller dieser Substanzen ist, daß sie leicht flüchtig sind. In Anlehnung an die Methode von *Rast* bringt man deshalb auch bei der Meßvorrichtung nach *Kofler* die zu untersuchende Substanz bzw. das Substanzgemisch in ein Kapillarröhrchen ein, das dann zugeschmolzen wird. An die Stelle des von *Rast* verwendeten Wärmebades tritt hier ein Wärmeblock *WB* (s. Abb. 1), der meist aus Aluminium angefertigt und mit einer Bohrung *B* versehen ist, die zur Aufnahme der Kapillare dient. Dieser Wärmeblock wird auf den Mikroheiztisch *MH* gestellt und die Temperatur mit dem seitlich in den Mikroheiztisch eingeführten Thermometer *Th* gemessen. Oben wird der Heiztisch durch eine Deckplatte *D* aus Glas abgeschlossen. Da nun das Heiztischthermometer meist für Messungen geeicht ist, bei denen die zu untersuchende Substanz auf einen Objektträger aufgetragen wird, muß natürlich bei Anwendung der Kapillarmethode eine Eichkurve aufgestellt werden.

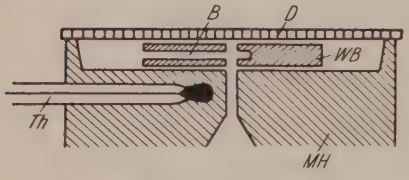


Abb. 1. Schema des Mikroheiztisches und des Wärmeblockes.

Bei der Erstellung einer solchen Eichkurve traten aber Schwankungen auf, deren Ursache zunächst nicht geklärt werden konnte. Um diesen auf die Spur zu kommen, war eine empfindlichere Meßeinrichtung erforderlich, weshalb man sich zur Verwendung eines Thermoelementes (Kupfer-Konstantan-Element) entschloß.

Der Aufbau der thermoelektrischen Meßeinrichtung.

In Anlehnung an die in Abb. 1 gezeigte Anordnung liegt eine 6 mm starke, kreisförmige Messingplatte auf dem Mikroheiztisch, die im Zentrum axial und diametral durchbohrt ist. Die axiale Bohrung dient als Lichtfenster (2 mm ⌀), in die diametrale (4 mm ⌀) ist ein Messingstab genau eingepaßt, der in axialen Bohrungen liegend Thermoelement und Probekapillare enthält. Genau in der Stabmitte befindet sich das Licht-

fenster. Um den Schmelzvorgang beobachten zu können, ragt die Kapillare zum Teil in dieses hinein. Auch das Thermoelement ist von einer Kapillare umgeben, die sowohl als Isolation als auch zur Herstellung der gleichen Wärmeverhältnisse gedacht ist, wie wir sie bei der mit Substanz gefüllten Kapillare vorfinden. Die beiden Drähte des Thermoelementes werden durch Nuten ins Freie abgeführt. Der Messingstab wird in die Bohrung der Platte so eingeführt, daß sich die Lichtfenster genau decken. Ein an die Platte angeschraubter Griff ermöglicht eine bequeme Handhabung.

Als Vergleichstemperatur dient der genau definierte Siedepunkt von Flüssigkeiten. Verwendet wurde zunächst für einen Meßbereich von

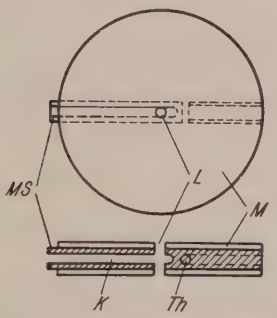


Abb. 2. Messingscheibe mit eingebautem Thermoelement.

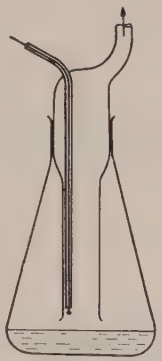


Abb. 3. Siedebad.

80 bis 115° C dest. Wasser. Für den Bereich von 115 bis 155° C wurde m-Xylol und von 155 bis 180° C Propylbenzol verwendet. Von diesen Flüssigkeiten ist die Luftdruckabhängigkeit des Siedepunktes bekannt[10].

Die Flüssigkeit wird nun in einem Erlenmeyerkolben zum Sieden gebracht, der mittels einer Asbestschnur wärmeisoliert ist. In diesen Kolben ist mittels eines Schliffes ein Rohr von etwa 25 mm ⌀ eingepaßt, das oben mit einem Rückflußkühler verbunden ist. Durch zwei Röhrchen, die oben dieses sogenannte Steigrohr durchbrechen, werden die beiden Drähte des Thermoelementes eingeführt. Das in den Kolben hineinragende Steigrohr endet etwa 1 cm oberhalb des Flüssigkeitsspiegels. Die Lötstelle des Thermoelementes befindet sich noch innerhalb des Rohres etwa 2 cm oberhalb der Flüssigkeit. Wenn nun die Flüssigkeit siedet, so steigt der Dampf innerhalb des Rohres auf und gelangt dann in den Rückflußkühler. Da das Steigrohr vom Dampf vollkommen eingeschlossen und der Kolben sehr gut wärmeisoliert ist, ist eine Abkühlung des Dampfes von der Flüssigkeitsoberfläche bis zur Lötstelle so gut wie ausgeschlossen.

Bei der Verwendung von Wasser wurden alle Messungen auf eine Vergleichstemperatur von 98° C bezogen, entsprechend einem Luftdruck von 707,5 Torr.

Als Strommeßgerät diente ein Multiflexgalvanometer der Type MGO von Dr. *B. Lange*, mit einem Innenwiderstand von 14 Ohm und einer Stromempfindlichkeit von $4{,}6 \cdot 10^{-8}$ A/Skalenteil.

Eichung, Kontrolle und Diskussion der Fehlerquellen.

Im vorliegenden Falle wurde, wie schon erwähnt, ein Kupfer-Konstantan-Thermoelement verwendet. Für ein solches liegen zwar Eichtabellen vor, die die Thermospannungen in Abhängigkeit von der Temperatur angeben, aber die darin angegebenen Werte gelten nur für speziell gereinigtes Kupfer und Konstantan. Da aber derartiges nicht vorhanden war, mußte das Element eigens geeicht werden.

Zur Eichung des Elementes wurden solche Substanzen verwendet, deren Schmelzpunkt möglichst genau bekannt ist. Für den Bereich von 80 bis 115° C standen folgende Substanzen zur Verfügung:

Naphthalin	Fp.	80,2° C
Anaesthesin	„	89,6° C
Acetanilid	„	115,0° C

Alle Messungen in diesem Temperaturintervall beziehen sich somit auf die Schmelztemperaturen dieser Testsubstanzen.

Mittels der vorliegenden Anordnung sollten also zunächst die zu den einzelnen Temperaturwerten gehörigen Thermospannungen möglichst genau ermittelt werden, um daraus später umgekehrt so genau als möglich die Schmelztemperaturen von anderen Substanzen zu bestimmen. Auf Grund der Erfahrung mit dem *Kofler*schen Mikroheiztisch und infolge eines Hinweises[11] war aber schon bekannt, daß die Aufheizgeschwindigkeit, d. h. die Schnelligkeit der zeitlichen Veränderung der Temperatur des Heiztisches, einen Einfluß auf das Meßergebnis hat, doch war man sich über die wahre Größe der Auswirkung nicht ganz im klaren. Außerdem waren die Messungen viel zu ungenau, als daß man hätte entscheiden können, ob die Schwankungen auf systematische oder rein zufällige Fehler zurückzuführen sind.

Es wurde nun rein empirisch die Abhängigkeit der gemessenen Schmelzpunkte T_g (°C) von der Aufheizgeschwindigkeit λ, gemessen in °C/min, untersucht. Dabei wurden die Messungen für jeweils drei verschiedene, mit der gleichen Substanz gefüllte Kapillaren durchgeführt. Abb. 4 zeigt das Ergebnis für Naphthalin (Fp. = 80,2° C).

Aus diesem Diagramm ist zu ersehen, daß man scheinbar einen höheren Schmelzpunkt erhält, wenn man mit größerer Aufheizgeschwindigkeit arbeitet und umgekehrt. Berücksichtigt man, daß bisher meist

bei $\alpha = {}^1/_2$ bis 1° C/min, ja sogar bis 2° C/min beobachtet wurde, so ist verständlich, daß die nach der Kapillarmethode erhaltenen Schmelzpunkte untereinander und von den nach anderen Methoden bestimmten um Beträge bis zu 2° C abweichen können.

Es lag nun auf der Hand, die Wärmeleitung in der Substanz als Ursache für die Abhängigkeit der gemessenen Schmelztemperatur von der Aufheizgeschwindigkeit anzunehmen, da das Durchschmelzen der Substanz nicht mit einem Schlage erfolgt, wie es bei dünnen Substanzschichten der Fall ist, sondern sich vielmehr über längere Zeit erstreckt.

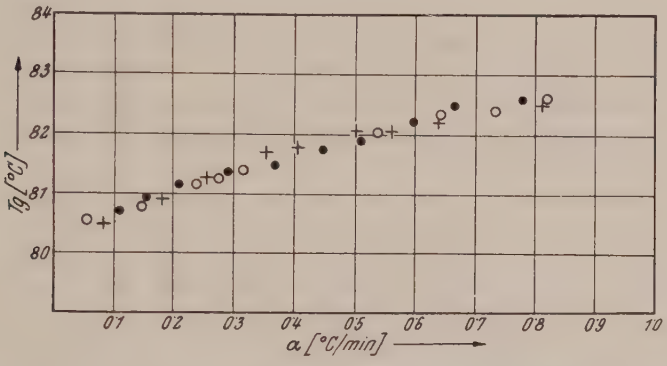


Abb. 4. Diagramm der Abhängigkeit des gemessenen Schmelzpunktes von der Aufheizungsgeschwindigkeit für drei verschiedene Kapillaren mit angenähert gleichem Durchmesser.

Nun greift das Thermoelement die Temperatur am inneren Rande der Kapillare ab, da die Lötstelle analog der Substanz in eine Kapillare eingeschlossen ist und die Dauer der Wärmeleitung im Metall gegenüber der in der Substanz vernachlässigbar klein ist. Je schneller nun die Temperatur am Heiztisch und damit auch am Kapillarrand erhöht wird, um so mehr wird diese in der Substanz gegenüber der am Kapillarrand nachhinken. Man wird, da die wirkliche Schmelztemperatur ja immer dieselbe ist, für größere Aufheizgeschwindigkeiten eben höhere Schmelztemperaturen messen. Diesen Effekt kann man deshalb zweckmäßig als Verzögerungseffekt bezeichnen.

Außerdem wird die Substanzdicke, d. h. der Innendurchmesser der Kapillare einen Einfluß auf diese Verzögerung haben. Je größer der Durchmesser, um so größer die Differenz zwischen der am Instrument angezeigten und der in der Substanz herrschenden Temperatur. Die Kurven werden also für Kapillaren mit größerem Innendurchmesser steiler ausfallen. Praktisch wird dies aber nicht so sehr ins Gewicht fallen, da man stets mit Kapillaren arbeitet, die angenähert den gleichen Durchmesser haben.

Heizt man nun sehr langsam auf, so wird auch die Verzögerung klein. Es ist dann genügend Zeit vorhanden, damit die Temperatur in der Substanz gegenüber der am Rande nachkommt. Heizt man unendlich langsam auf, so ist leicht einzusehen, daß die Temperatur am Rande und im Substanzinneren stets gleich ist, daß also die wahre Schmelztemperatur angezeigt wird. Dies gilt für Kapillaren beliebiger Dicke, so daß sich also alle Kurven in einem Punkte, dem wahren Schmelzpunkt, treffen müssen.

Hinweise auf die mathematische Behandlung des Problems.

Es lag nun die Aufgabe vor, den Kurvencharakter festzustellen. Man war zunächst versucht, die Punkte einfach durch eine Gerade zu verbinden. Dies ist aber nicht korrekt, denn es zeigte sich bei allen diesen Diagrammen, daß die Kurven für größere Abszissenwerte nach unten geneigt sind. Deshalb war eine eingehendere theoretische Untersuchung des Problems notwendig.

Dabei wurde etwa wie folgt vorgegangen: Man betrachtet die Messingscheibe als eine homogene Wärmequelle. In dieser Scheibe befindet sich eine zylindrische Bohrung, in die die Kapillare eingebracht wird (vgl. Abb. 2). Da nun die Meßlötstelle ebenfalls von einem Kapillarrohr von angenähert der gleichen Wandstärke umgeben ist, kann man den Wärmeübergang zwischen Messing und Glas vernachlässigen. Man interessiert sich daher nur für die Temperaturverhältnisse in der Substanz. Vom mathematischen Standpunkt aus gesehen, liegt also ein gewöhnliches zylindersymmetrisches Wärmeleitproblem vor. Dabei erfahren die Rand- und Anfangsbedingungen eine entsprechende Formulierung.

Es würde zu weit führen, die Durchrechnung des Problems hier anzuführen. Es seien lediglich die Ergebnisse erwähnt, so weit sie für uns von Interesse sind.

Zunächst wurde das Problem für den Fall behandelt, daß die Temperatur am Rande des Zylinders linear mit der Zeit zunimmt. Als Anfangsbedingung wurde eine gleichmäßige Temperaturverteilung angenommen. In diesem Falle erhält man die am Instrument angezeigte Temperatur T_g als Funktion der Aufheizgeschwindigkeit durch folgenden Ausdruck:

$$T_g = \left\{ \sum_{\nu=1}^{\infty}{}' \frac{2}{p_{0\nu} \cdot J_1(p_{0\nu})} \cdot \frac{1 - e^{-\gamma^2 p_{0\nu}^2 \tau}}{\gamma^2 \cdot p_{0\nu}^2} \right\} \lambda \cdot T_s$$

$J_1(p_{0\nu})$ sind die *Besselsc*hen Zylinderfunktionen 1. Ordnung an der Stelle $p_{0\nu}$, wobei $p_{0\nu}$ die Nullstellen der Besselfunktionen nullter Ordnung sind. Beide Werte können Tabellen entnommen werden. γ^2 ist eine für die Substanz und die Kapillare charakteristische Konstante und ist gegeben durch

$$\gamma^2 = \frac{a^2}{r_1^2},$$

worin a^2 die Temperaturleitfähigkeit und r_1 der Innenradius der Kapillare ist. τ bedeutet die Einstellzeit. Dies ist jene Zeit, die man benötigt, um von einer bestimmten Temperatur ausgehend den Schmelzpunkt zu erreichen. T_s ist die wahre Schmelztemperatur.

Wie aus dem nun folgenden Diagramm ersichtlich ist, beschreibt obige Gleichung ganz gut die Beziehung zwischen den Meßwerten und der Aufheizgeschwindigkeit. Lediglich für große Abszissenwerte weicht die Kurve von den Meßwerten nach oben ab.

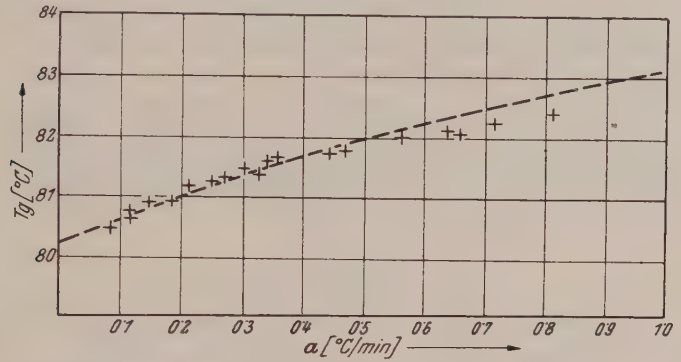


Abb. 5. Dieses Diagramm zeigt die gemessenen und die berechneten Werte für Naphthalin.

Betrachtet man nun diese Beziehung für kleine Aufheizgeschwindigkeiten, so sieht man sofort, daß die in der Summe enthaltene e-Funktion vernachlässigbar klein wird und wir erhalten einen linearen Zusammenhang. Praktisch ist dies für die Aufheizgeschwindigkeit kleiner als $^3/_{10}$° C/min der Fall. Es ist dann

$$T_g = \left\{ \sum_{v=1}^{\infty} \frac{2}{\gamma^2 p_{0v}{}^3 J_1 (p_{0v})} \right\} \alpha + T_s.$$

In diesem Falle sind nur die Meßpunkte durch eine Gerade auszugleichen und deren Ordinatenabschnitt zu berechnen.

Nun wurde dieses Problem noch für eine anders formulierte Randbedingung durchgerechnet. Dabei wurde berücksichtigt, daß in Wirklichkeit die Aufheizgeschwindigkeit eine gewisse Zeit benötigt, um einen Höchstwert zu erreichen. Es wurde ein sogenannter Anlaufvorgang eingeführt. Dieser läßt sich mathematisch wie folgt ansetzen:

$$\alpha = \alpha_0 (1 - e^{-\varkappa t}).$$

Daraus folgt für die Temperatur am Zylinderrand in Abhängigkeit der Zeit

$$T (r_1, t) = \alpha_0 \left(t + \frac{e^{-\varkappa t}}{\varkappa} \right) + T_0 - \frac{\alpha_0}{\varkappa}.$$

Die Lösung des Problems für obige Randbedingung ist dann gegeben durch:

$$T_g = \left\{ \sum_{v=1}^{\infty} \frac{2}{p_{0v} J_1(p_{0v})} \left(\frac{1 - e^{-\gamma^2 p_{0v} \tau}}{\gamma^2 p_{0v}^2} + \frac{e^{-\gamma^2 p_{0v}^2 \tau} - e^{-\varkappa \tau}}{\gamma^2 p_{0v}^2 - \varkappa} \right) \right\} \alpha_0 + T_s.$$

Tatsächlich gibt dieser Ausdruck die Verhältnisse für große Aufheizgeschwindigkeiten besser wieder, da der zweite Summand in der Summe stets negativ ist und den Summenwert gegenüber dem früheren daher verkleinert, d. h. die Ordinatenwerte werden verkleinert. Was aber wesentlich erscheint, ist, daß man für kleine α dieselbe Gerade erhält wie im ersten Fall. Damit erscheint die Linearität im Bereich der kleinen Aufheizgeschwindigkeiten gesichert.

Ich möchte an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. Dr. Mag. *Ludwig Kofler*s † dankbar gedenken, der die Anregung zu dieser Arbeit gab. Weiters gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. *R. Steinmaurer* für sein stets förderndes Interesse an der Durchführung der Arbeit.

Zusammenfassung.

Die Aufheizgeschwindigkeit bei Temperaturmessungen am Mikroheiztisch nach *Kofler*, bei denen die Temperatur während des Meßvorganges variiert wird, muß unbedingt berücksichtigt werden, sofern man eine größere Meßgenauigkeit als 1 bis 2° C erreichen will. Dies trifft natürlich für die hier zitierte Methode nach *Rast* in erster Linie zu. Es genügt auch nicht, wenn man sich ein für allemal auf eine bestimmte Aufheizgeschwindigkeit festlegt. Ganz abgesehen davon, daß dies praktisch nicht durchführbar ist, muß berücksichtigt werden, daß die Neigung der Kurven infolge verschiedener Temperaturleitfähigkeiten der Substanzen verschieden sein kann. Deshalb muß stets die Extrapolation für die unendlich kleine Aufheizgeschwindigkeit durchgeführt werden, d. h. man muß einfach den Ordinatenabschnitt der Kurve aufsuchen. Um die Ausgleichung der Kurve möglichst einfach zu halten, ist es zweckmäßig, in dem Bereich zu arbeiten, in dem Linearität herrscht, d. h. die Aufheizgeschwindigkeit kleiner als 0,3° C/min zu halten.

Summary.

If an accuracy greater than 1–2° C is desired, it is absolutely necessary to take account of the rate of heating during temperature measurements on the *Kofler* micro heating stage if the temperature is varied during the measuring procedure. This naturally applies primarily to the *Rast* method cited here. It is also not sufficient to establish a given heating rate once and for all. Apart from the fact that this cannot be done in practice, it must be noted that the inclination of curves can vary because of the differences in the heat conductivity of the materials. Consequently, it is always necessary to extrapolate for the infinitely small heating rates, i. e. the ordinate section

of the curves must be found. To get continuous curves as simply as possible, it is best to work in the region where there is linearity, i. e. to keep the heating rate less than 0.3° C/minute.

Résumé.

La vitesse d'échauffement pour la mesure de la température au microbloc de *Kofler* lorsque cette température varie au cours de la mesure, doit être reconsidérée purement et simplement si l'on veut atteindre une exactitude aussi grande que 1 à 2° C. Ceci a lieu en première ligne naturellement par la méthode de *Rast* citée ici. Cela ne suffit pas dans tous les cas ou l'on se fixe une vitesse de chauffage déterminée. En pratique, on a vu que ceci n'est pas exécutable; il faut considérer que la pente des courbes en fonction des diverses conductions thermiques des substances peut être différente. C'est pourquoi, on doit toujours faire une extrapolation pour des vitesses de chauffage infiniment petites, c'est-à-dire que l'on doit chercher simplement l'endroit ou la courbe coupe l'axe des ordonnées. Pour simplifier l'égalisation de la courbe aussi bien que possible, il est recommandé de travailler dans le domaine ou la linéarité est atteinte, de facon à obtenir des vitesses d'échauffement plus petites que 0,3° C par minute.

Literatur.

[1] *J. H. van't Hoff*, Z. physik. Chem. **1**, 481 (1887); Ostwalds Klassiker der exakten Wissenschaften, Nr. 110, S. 70. Leipzig: Akademische Verlagsges. 1886.

[2] *F. M. Raoult*, Ann. chim. phys. (5) T. 28, (6) T. 2; Z. physik. Chem. **27**, 653 (1898).

[3] *E. Beckmann*, Z. physik. Chem. **2**, 715 (1888).

[4] *J. F. Eykmann*, Z. physik. Chem. **2**, 964 (1888); **3**, 113, 203 (1889); **4**; 497 (1889).

[5] *O. v. Auwers*, Z. physik. Chem. **18**, 615 (1895); **30**, 300 (1899); **32**, 45 (1900); **42**, 629 (1903).

[6] *R. Kremann*, Mh. Chem. **36**, 911 (1915); **42**, 147 (1921).

[7] *K. Rast*, Ber. dtsch. chem. Ges. **55**, 1051, 3727 (1922).

[8] *E. Hückel*, Ann. Chem. **518**, 184 (1935).

[9] *L. Kofler* und *A. Kofler*, Mikromethoden zur Kennzeichnung organischer Stoffe und Stoffgemische. Innsbruck: Universitätsverlag Wagner. 1948.

[10] *Landolt-Börnstein-Roth-Scheel*, Physikalisch-chemische Tabellen. Hauptwerk 2. Bd., S. 1327. Berlin: J. Springer. 1923.

[11] *M. Brandstätter* und *L. Kofler*, Mikrochem. **34**, 364 (1949).

Aus dem Medizinisch-chemischen Institut und Pregl-Laboratorium der Universität Graz.

Mikrotitrationen mit Äthylendiamintetraessigsäure. IX.

Die Bestimmung des Indiums.

Von

H. Flaschka und A. M. Amin.

(Eingelangt am 21. Juli 1953.)

Vor kurzem haben wir über die komplexometrische Bestimmung des Indiums in reinen Indiumlösungen sowie auch in Lösungen, die sonstige Metalle enthalten, berichtet[1]. Beleganalysen bis herab zu ungefähr 2 mg Indium wurden dabei mitgeteilt. Die damals auch angestellten Versuche, das Verfahren auf Mikrogrammbereiche auszudehnen, schlugen insoferne fehl, als sich bei der Titration hochverdünnter Indiumlösungen unter Verwendung von 0,001-m Komplexonlösung stets Überwerte von oft beträchtlichem Ausmaße ergaben. Der Grund für dieses unerwartete Verhalten konnte aber gefunden werden und nach Beseitigung der Störung ergaben sich auch für Indiummengen weit unter 1 mg sehr zufriedenstellende Resultate.

Vor Ausführung der Titration wird die Indiumlösung mit Tartration versetzt, um die Bildung von Indiumhydroxyd zu verhindern, und mit Ammoniak-Ammoniumchloridpuffer auf p_H = 10 gebracht. Sodann titriert man nach Zugabe von Indikator (Eriochromschwarz T) in der Siedehitze bis zum Farbwechsel von rot nach blau. Das Arbeiten in kochender Lösung ist nötig, weil der Tartratkomplex nur sehr langsam reagiert und in der Kälte stets ein rückläufiger Farbwechsel erzeugt wird.

Nun wird aber in der ammoniakalischen, komplexonhaltigen Lösung in der Siedehitze das Glas des Titrationsgefäßes angegriffen, indem Calcium und/oder Magnesium herausgelöst werden, was bei 0,001-m Maßlösung bereits einen so hohen zusätzlichen Verbrauch von Komplexon bewirkt, daß die Überwerte jede noch tragbare Grenze überschreiten, auch wenn man Jenaerglas verwendet. Für gewöhnliches Glas haben diese Erscheinung schon *Biedermann* und *Schwarzenbach*[2] auch bei

0,1-m Lösungen festgestellt. Nachdem diese Ionenabgabe des Glases als Fehlerquelle erkannt worden war, konnte dem Übel unschwer abgeholfen werden, indem die verwendeten Gefäße einer Vorbehandlung unterzogen wurden. Diese besteht darin, daß man die Gläser mit einer zirka 2%igen ammoniakalischen Komplexonlösung einige Minuten auskocht. Durch diese Prozedur werden aus der Glasoberfläche alle störenden Ionen entfernt und ein Gleichgewichtszustand erreicht, der sich sonst erst nach langem Gebrauch einstellt. Mit solcherart vorbehandelten Geräten erhält man Werte, die zwar immer noch eine ganz leichte Tendenz zur Plusseite aufweisen, jedoch innerhalb der zu erwartenden Fehlergrenze weniger Mikrogramme bleiben.

Da man im Endpunkt die Lösung noch einmal aufkochen soll, um feststellen zu können, ob die blaue Endfarbe des freien Eriochromschwarz T bestehen bleibt bzw. ob der Zusatz eines weiteren Tropfens von Maßlösung keine Änderung des Farbtones bewirkt, empfiehlt es sich, die Titration in Zentrifugengläsern durchzuführen, da hierin Farbänderungen durch den einfallenden Tropfen besonders leicht beobachtet werden können. Beim Rühren mit dem Glasstäbchen muß allerdings beachtet werden, daß man tunlichst keine Kratzbewegung an der Wand durchführt, da durch diese kleinste Glassplitter abgerieben werden, die sehr stark zu erneuter Calciumabgabe neigen.

Lösungen und Reagenzien:

0,001-m Komplexonlösung: 0,3722 g Dinatrium-Äthylendiamintetraacetat-dihydrat werden in Wasser zu 1 l gelöst.

Puffer: 13,4 g Ammoniumchlorid und 88 ml konz. Ammoniak werden mit Wasser zu 250 ml gelöst.

Indikator: Eriochromschwarz T wird mit Natriumchlorid im Verhältnis 1:400 innigst verrieben.

Kaliumcyanidlösung, 5%ig.

Kalium-Natrium-Tartrat-Lösung, 5%ig.

Die Indiumlösungen wurden durch Auflösen von reinstem Indiummetall in Salpetersäure und Auffüllen auf bekanntes Volumen hergestellt. Der Gehalt wurde aus der Einwaage berechnet.

Verschiedene Metallsalzlösungen wurden durch Einwaage von analysenreinen Präparaten hergestellt.

Arbeitsvorschrift.

Die nötigenfalls gegen eine Spur Methylrot neutralisierte Indiumlösung wird in einem 15 ml Zentrifugenglas mit 2 ml Tartrat und 2 ml Pufferlösung versetzt und durch Eintauchen des Gefäßes in kochendes Wasser nahe zum Sieden gebracht. Zur Maskierung allenfalls vorhandener Schwermetallspuren ist die Zugabe von 1 bis 2 Tropfen Kaliumcyanid-

lösung zu empfehlen. Die heiße Titrationslösung versetzt man nun mit Indikatorpulver, bis eine deutlich sichtbare Rotfärbung entsteht und titriert dann mit 0,001-m Maßlösung bis zum bleibenden Umschlag nach Blau. Beim Endpunkt taucht man das Röhrchen nochmals ins kochende Wasser und versetzt anschließend mit einem weiteren Tropfen Maßlösung. Erzeugt dieser keine Farbänderung, dann ist die Titration beendet. Die Zentrifugenröhrchen und Rührstäbchen sind vor dem Gebrauch zur komplexometrischen Mikrotitration mit einer stark ammoniakalischen 2%igen Komplexonlösung auszukochen und gut mit Wasser nachzuspülen.

Tabelle 1. Bestimmung von Indium in reinen Indiumlösungen.

μg Indium		
gegeben	gefunden	Differenz
104	102	— 2
117	119	2
159	163	4
221	221	0
309	305	— 4
408	410	2
588	593	5
734	741	7
816	814	— 2
995	999	4

Tabelle 2. Bestimmung von Indium neben Fremdmetallen.

Die Titration wurde in Lösungen durchgeführt, die neben Indium jeweils folgende Mengen an Fremdionen enthielten: 14 mg Hg; 15 mg Cd; 15 mg Zn; 10 mg Ni; 10 mg Co; 10 mg Cu.

μg Indium		
gegeben	gefunden	Differenz
117	118	1
176	180	4
234	234	0
351	355	4
410	415	5
585	580	— 5
842	838	— 4
836	836	0
978	969	— 9

Enthält die Indiumlösung Quecksilber, Kupfer, Cadmium, Zink, Kobalt oder Nickel, so werden diese mit Kaliumcyanid im Überschuß in die entsprechenden Polycyanidkomplexe übergeführt, was Tarnung gegenüber Eriochromschwarz T und Komplexon bewirkt. In Gegenwart von Eisen ist nach der Überführung in die Polycyanide noch etwas Hydroxylaminhydrochlorid zuzusetzen, um vollständige Reduktion zum Ferrocyanid zu erzielen. Es sollen nicht mehr als maximal 5 mg Eisen zugegen sein.

1 ml 0,001-m Komplexonlösung entspricht 114,76 μg Indium.

Über die mit dieser Methode unter Verwendung einer 10-ml-Bürette mit $^1/_{50}$-Teilung erzielbare Genauigkeit informieren Tab. 1 und 2.

Herr Prof. Dr. *H. Lieb* stellte uns für die Arbeit die Geräte in seinem Institute zur Verfügung. Die Unterharzer Berg- und Hüttenwerke A. G., Oker, Deutschland, überließ uns reinstes Indiummetall. Die Maßlösung

wurde aus Sequestrene NA 2, das uns die Alrose Chemical Co, Providence, R. I., USA, zusandte, hergestellt. Es ist uns eine angenehme Pflicht, den Genannten auch an dieser Stelle für die Unterstützung der Arbeit bestens zu danken.

Zusammenfassung.

Es wird über die Möglichkeit einer direkten komplexometrischen Indiumbestimmung berichtet. Das Indium reagiert in ammoniakalischer, Tartrat enthaltender Lösung mit Eriochromschwarz T unter Bildung eines roten Komplexes. Diesem wird durch das Komplexon das Indium entzogen und die blaue Farbe des freien Farbstoffes erscheint beim Endpunkt der Titration. Diese kann neben einigen Schwermetallen, die durch Kaliumcyanid maskiert werden, mit sehr gutem Ergebnis durchgeführt werden.

Summary.

A report is given of the possibility of a direct complexometric determination of indium. Indium, in an ammoniacal solution containing tartrate, reacts with Eriochrom black T to form a red complex. The indium is withdrawn from the latter by the complexone and the blue color of the free dyestuff appears at the endpoint of the titration. The procedure works well in the presence of several heavy metals, which can be masked with potassium cyanide.

Résumé.

On indique la possibilité d'un dosage d'indium par complexométrie directe. L'indium réagit en solution ammoniacale contenant un tartrate avec le noir Eriochrome T en formant un complexe rouge. L'indium est extrait de ce complexe par le complexone et la couleur bleue du colorant apparait au point équivalent. En présence de quelques métaux lourds, de très bons résultats peuvent être obtenus si l'on masque avec du cyanure de potassium.

Literatur.

[1] *H. Flaschka* und *A. M. Amin*, Z. analyt. Chem. Im Druck.
[2] *W. Biedermann* und *G. Schwarzenbach*, Chimia **2**, 56 (1948).

Aus dem Medizinisch-chemischen Institut und Pregl-Laboratorium der Universität Graz.

Mikrotitrationen mit Äthylendiamintetraessigsäure. X.

Die direkte Titration von Mangan in reinen Lösungen und neben anderen Metallen.

Von

H. Flaschka und A. M. Amin.

(Eingelangt am 27. Juli 1953.)

Die Möglichkeit, Calcium und Magnesium in Gegenwart einiger Metalle, die sich mit Kaliumcyanid maskieren lassen, komplexometrisch zu titrieren, ist von *Biedermann* und *Schwarzenbach*[1] angedeutet worden. Die Ausdehnung dieses Verfahrens auf andere Metalle wurde von *Flaschka* und Mitarbeitern untersucht. So wurde es möglich, Blei in Gegenwart von Tartrat und Cyanid neben einer Reihe anderer Metalle selektiv zu bestimmen[2] und auch für Indium hat sich die Methode sehr gut bewährt[3,4]. Auch Mangan ist einer direkten Titration zugänglich, wenn man durch Zugabe eines Reduktionsmittels dafür sorgt, daß in ammoniakalischer Lösung keine Oxydation durch den Luftsauerstoff erfolgen kann[5]. Das Mangan läßt sich dann auch in sehr kleinen Mengen und bei geringer Konzentration mit großer Schärfe titrieren. Die Cyanverbindungen des zweiwertigen Mangans sind sehr wenig stabil und dieses Metall reagiert daher auch neben Cyanidionen mit Eriochromschwarz T unter Ausbildung eines roten Komplexes, der zur Endpunktsanzeige für eine Titration ähnlich wie beim Blei verwendet werden kann. Durch das Cyanid können einige Metalle maskiert werden.

Über die Zersetzung der Polycyanidkomplexe von Zink und Cadmium auf Zusatz von Formaldehyd ist jüngst berichtet worden[6,7]. Das Verfahren ermöglicht die Bestimmung dieser beiden in Gegenwart anderer Metallionen, deren Polycyanidkomplexe durch Formaldehyd nicht zerlegt werden. Es gestattet aber auch die Bestimmung von Zink oder Cadmium und einem anderen mit Cyanid nicht reagierenden Metall in ein und derselben Lösung. Hierzu wird das nicht reagierende Metall, z. B. Calcium,

Magnesium oder Blei neben dem mit Cyanid maskierten Zink (oder Cadmium) titriert. In der austitrierten Lösung setzt man durch Formalin das Zink in Freiheit und bestimmt es anschließend.

All diese bereits anderwärts erprobten Verfahren lassen sich in geeigneter Modifikation auch auf das Mangan anwenden.

Sowohl bei früheren Untersuchungen als auch insbesondere bei den anläßlich der Mangantitrationen angestellten Experimenten mußte festgestellt werden, daß bei einem zu großen Überschuß von Formalin die nachfolgende Zinktitration in Gegenwart z. B. von gebundenem Kupfer oder Nickel undurchführbar wurde. Die Gefahr, zu viel Formaldehyd zu nehmen, ist bei Mikroarbeiten wesentlich größer, so daß ein eingehenderes Studium der vorliegenden Verhältnisse geboten schien. Das Ergebnis dieser Versuche ist kurz zusammengefaßt folgendes: Auch Kupfer- und Nickelpolycyanidkomplexe reagieren in alkalischem Medium mit Formaldehyd, wobei unter Bildung von Glykolsäurenitril das Metall in Freiheit gesetzt wird[8]. Diese Reaktion verläuft allerdings sehr langsam, wie an einer mit Borat gepufferten Lösung von Kaliumnickeltetracyanid gezeigt werden konnte. Arbeitet man, wie bei allen bisher gegebenen Vorschriften in ammoniakalischer Lösung, so läuft nebenher die wesentlich raschere Reaktion zwischen Ammoniumion und Formaldehyd ab, die zur Bildung von Urotropin führt. So wird es möglich, Zink oder Cadmium freizusetzen, ohne daß das die Indikatorreaktion der Titration z. B. störende Kupfer oder Nickel frei wird, da vorher schon der Formaldehydüberschuß vom Ammonium abgefangen wird. Ähnlich dem Formaldehyd reagiert Chloralhydrat mit freiem Cyanid und solchem, das an Zink oder Cadmium gebunden ist. Mit anderen Schwermetallcyaniden bleibt auch in Abwesenheit von Ammoniumionen jegliche Reaktion aus. Deshalb gibt *Přibil*[9] diesem Reagens dem Formaldehyd gegenüber den Vorzug. Wir versuchten, auch das Zink in Mikromengen mittels Chloralhydrat in Freiheit zu setzen, hatten hierbei aber keine guten Erfolge zu verzeichnen, so daß die Rückkehr zur Verwendung von Formalin geboten schien. Bei Kenntnis und Beachtung des eben Mitgeteilten erhält man jedoch auch mit Formaldehyd vorzügliche Resultate. Man muß aber eine Überdosierung vermeiden, indem man das Reagens portionsweise zusetzt bis neuerliche Zugabe keine sofortige Nachrötung der Probe mehr bewirkt.

Die Mangantitration selbst wird, wie schon oben erwähnt, in Gegenwart eines Reduktionsmittels durchgeführt. Hierdurch soll vermieden werden, daß sich unter dem oxydativen Einfluß von Luftsauerstoff Mangandioxydhydrat bildet. Dieses wirkt auf Eriochromschwarz T stark oxydierend, wobei sich braune Zersetzungsprodukte bilden, die irreversibel zur Unbrauchbarkeit des Indikators führen. Liegt reines Mangan(2)-ion vor, dann verhält sich dieses dem Farbstoff gegenüber wie Magnesium

und bildet einen weinrot gefärbten Komplex, dessen Stabilität geringer ist als die des Mangankomplexonkomplexes, so daß Komplexon dem Farbstoffkomplex Mangan entziehen kann, worauf im Endpunkt der Titration die rein blaue Farbe des freien Eriochromschwarz T erscheint.

Tabelle 1. Titration von Mangan in reinen Lösungen.

μg Mangan		
Gegeben	Gefunden	Differenz
17,0	16,9	— 0,1
52,3	50,6	— 1,7
122	121	— 1
349	352	3
500	501	1
866	864	— 2
943	944	1
1240	1238	— 2

Durch Kaliumcyanid lassen sich neben Mangan folgende Metalle maskieren: Quecksilber, Kupfer, Cadmium, Zink, Kobalt und Nickel. Eisen in mehr als verunreinigenden Mengen stört, da sich auch in Gegenwart von Tartration unlösliche Verbindungen abscheiden. Die Titration kann nicht durchgeführt werden neben Ionen, die mit Eriochromschwarz T unter Ausbildung stabiler Komplexe ragieren wie z. B. Aluminium. Blei

Tabelle 2. Titration von Mangan neben anderen Metallen.

μg Mangan			Fremdmetall	Ungefähre Menge in mg
Gegeben	Gefunden	Differenz		
215	209	— 6		
	219	4		
	215	0	Co	10
383	380	— 3		
645	640	— 5		
946	953	7		
215	211	— 4		
303	302	— 1	Ni	7
860	866	6		
194	192	— 2		
340	346	6	Hg	5
860	860	0		
430	428	— 2		
	432	2	Cu	6
573	573	0		
645	642	— 3		
215	214	— 1	Zn	2
335	338	3	Cd	2
502	506	4	Cu	3
645	653	8	Co	8
1075	1077	2	Hg	4
			Ni	4

und die Erdalkalien werden mittitriert und sind vorher zu entfernen. Bezüglich einer einfachen Abscheidung von Mangan neben den Erdalkalien vergleiche man die Angaben von *Pilz*[10]. Das dort angeführte indirekte Titrationsverfahren nach Auflösen des Mangansulfids wird sich vorteilhaft durch die hier mitgeteilte direkte Methode ersetzen lassen.

Tabelle 3. Bestimmung von Mangan und Zink in einer Probe.

µg Mangan			µg Zink		
Gegeben	Gefunden	Differenz	Gegeben	Gefunden	Differenz
17,5	17,6	0,1	416	416	0
34,5	32,1	— 2,4	615	614	— 1
104	103	— 1	615	614	— 1
237	237	0	262	262	0
500	501	1	262	260	— 2
667	659	— 8	262	265	3

Tabelle 4. Bestimmung von Mangan und der Summe Zink + Cadmium in einer Probe.

µg Mangan			ml 0,001-m Komplexon für Summe Zn + Cd		
Gegeben	Gefunden	Differenz	Berechnet	Gefunden	Differenz
86	86	0	15,86	15,89	0,03
215	216	1		15,80	— 0,06
430	427	— 3		15,85	— 0,01
	433	3	11,91	11,82	— 0,09
	432	2	4,00	3,96	— 0,04

Ohne Störung kann Mangan neben all jenen Kationen titriert werden, die mit Komplexon und Eriochromschwarz T nicht reagieren, wie z. B. Alkalien, Thallium (1), Silber, Arsen, Antimon usw.

Um eine Hydroxydfällung des Mangans oder eines der Begleitmetalle mit Sicherheit auszuschließen, empfiehlt es sich, der Probelösung eine ausreichende Menge von Tartration zuzusetzen. Wie in den vorigen Mitteilungen über die Bestimmung von Indium[3,4] ausführlich beschrieben, reagiert auch der Tartratkomplex des Mangans, wenn auch nicht in so eklatanter Art, so doch merklich langsam. Dies bedeutet auch hier, daß bei erhöhter Temperatur zu titrieren ist. Es ist keinesfalls nötig, wie beim Indium in kochender Lösung zu arbeiten, doch soll eine Temperatur von 70 bis 80° C eingehalten werden. Bei sehr verdünnter Lösung ist auch im vorliegenden Falle damit zu rechnen, daß aus dem Glas des Gefäßes Calcium und/oder Magnesium in Mengen abgegeben werden, die einen ständigen Rücklauf des Indikatorumschlages bewirken (vgl. hierzu

auch [1]). Daher ist auch für die Manganmikrobestimmung eine Vorbehandlung der Titrationsgefäße mit ammoniakalischer, 2%iger Komplexonlösung in der Siedehitze anzuraten, wodurch diesem Übel vorgebeugt werden kann.

Lösungen und Reagenzien.

0,00100-m Komplexonlösung: 0,3722 g Komplexon III (Dinatriumäthylendiamintetraacetat-dihydrat) werden in Wasser zu 1 l gelöst.

Puffer: 13,4 g Ammoniumchlorid und 88 ml konz. Ammoniak werden in Wasser zu 250 ml gelöst.

Kaliumcyanid, 5%ig in Wasser.

Kalium-Natrium-tartrat, 5%ig in Wasser.

Indikator: Eriochromschwarz T und Natriumchlorid werden im Verhältnis 1:400 innigst verrieben.

Die Mangansalzlösungen wurden nach der seinerzeit mitgeteilten indirekten Titration[11] gestellt.

Die weiters verwendeten Metallsalzlösungen wurden durch Auflösen von analysenreinen Präparaten hergestellt.

Formaldehyd, 10%ig.

Ascorbinsäure, fest.

Arbeitsvorschrift.

a) Reine Mangansalzlösung. Die wenn nötig gegen eine Spur Methylrot neutralisierte Probe wird mit einigen Tropfen Tartratlösung und je 50 ml Probe mit 2 bis 3 ml Puffer versetzt. Die Zugabe von 1 bis 2 Tropfen Kaliumcyanidlösung empfiehlt sich zwecks Maskierung allenfalls vorhandener Spuren von Schwermetallen. Nun erwärmt man die Probe auf 70 bis 80° C, nachdem mit 20 bis 30 ml Ascorbinsäure reduziert wurde, und titriert sofort bis zum bleibenden Umschlag nach Blau.

b) Mangan neben anderen Metallen (Hg, Cu, Cd, Zn, Co, Ni): Die nötigenfalls gegen eine Spur Methylrot neutralisierte Probe wird mit Tartrat und Puffer versetzt und mit 20 bis 30 mg Ascorbinsäure reduziert. Sodann setzt man Kaliumcyanidlösung zur Bindung der Fremdmetalle im Überschuß zu und erwärmt nach Zusatz von noch etwas Ascorbinsäure auf 70 bis 80° C und titriert auf Blau.

c) Titration von Zink oder Cadmium nach beendeter Mangantitration. Die gemäß b) austitrierte Lösung läßt man erkalten und setzt unter gutem Umrühren aus einer Tropfpipette nach und nach Formaldehydlösung zu, bis der Indikator wieder nach Rot umschlägt. Nun titriert man auf Blau, wobei der Umschlag sehr schleppend ist, wenn noch nicht alles Zink oder Cadmium in Freiheit gesetzt wurde. Man gibt erneut Formalin zu, bis der Farbwechsel von Rot nach Blau scharf ist (1 Tropfen

0,001-m Maßlösung oder weniger genügen) und auf erneuten Formalinzusatz nicht wieder sofortige Rötung erfolgt.

Bemerkungen: Die Titration soll im p_H-Bereich von 8 bis 10 vor sich gehen. Es ist genügend zu puffern. Man muß beachten, daß bei größerer Metallbeimengung erhebliche Kaliumcyanidmengen erforderlich sind, um vollständige Maskierung zu erzielen. Dies kann eine unerwünschte Steigerung des p_H bewirken, die nötigenfalls durch Zusatz von Ammoniumchlorid rückgängig gemacht werden soll (Indikatorpapier[6]). Wurde viel Formalin zugesetzt, so tritt die oben beschriebene Urotropinbildung ein, wobei Säure frei wird, was eine unerwünschte Senkung des p_H bewirken kann. Daher auch hier p_H-Kontrolle und nötigenfalls erneuter Zusatz von Puffer.

Waren Zink und Cadmium gleichzeitig in der Probe vorhanden, dann wird die Summe beider erfaßt.

1 ml 0,001-m Komplexonlösung entspricht 54,93 μg Mn
112,41 „ Cd
65,38 „ Zn

Auf die Möglichkeit, Summentitrationen, wie bei Blei[2] auszuführen oder Differenzverfahren in zwei aliquoten Anteilen der Probe anzuwenden, sei verwiesen.

Die Titration läßt sich unschwer auf $\pm$ 0,02 bis 0,03 ml einer 0,001-m Komplexonlösung durchführen, was bei dem geringen Äquivalentgewicht des Mangans eine hohe Genauigkeit von wenigen Mikrogramm ergibt, wie man den Tabellen entnehmen kann.

Herr Prof. Dr. *H. Lieb* hat uns in seinem Institute Arbeitsplatz und Geräte zur Verfügung gestellt. Die Fa. Siegfried, Zofingen, Schweiz, unterstützte uns durch Überlassung der Komplexonchemikalien. Den Genannten möchten wir auch an dieser Stelle für ihr Entgegenkommen herzlichst danken.

Zusammenfassung.

Es wird gezeigt, daß sich Mangan in ammoniakalischer, tartrathaltiger, mit Ascorbinsäure reduzierter Lösung gegen Eriochromschwarz T direkt komplexometrisch titrieren läßt. Eine Reihe von Schwermetallen kann durch Zugabe von Kaliumcaynid maskiert werden. Zink und Cadmium können nach erfolgter Mangantitration durch Zugabe von Formalin demaskiert und in derselben Probe titriert werden.

Summary.

It is shown that manganese in ammoniacal, tartrate-containing solution, reduced with ascorbic acid, can be titrated complexometrically directly against Eriochrome black T. A number of heavy metals can be masked by

adding potassium cyanide. After the manganese titration is finished, zinc and cadmium can be demasked by means of formalin and then titrated in the same sample.

Résumé.

On constate que le manganèse peut se titrer par complexométrie directe avec le noir Eriochrome T dans une solution ammoniacale et tartrique réduite par l'acide ascorbique. Une série de métaux lourds peut être masquée par addition de cyanure de potassium. Après titrage du manganèse, le zinc et le cadmium peuvent être démasqués par le formaldéhyde et titrés sur le même échantillon.

Literatur.

[1] *W. Biedermann* und *G. Schwarzenbach*, Chimia **2**, 56 (1948).
[2] *H. Flaschka* und *F. Huditz*, Z. analyt. Chem. **137**, 172 (1952).
[3] *H. Flaschka*, Z. analyt. Chem. im Druck.
[4] *H. Flaschka*, Mikrochim. Acta **1953**, 410.
[5] *H. Flaschka*, Chemist-Analyst **42**, 56 (1953).
[6] *H. Flaschka*, Z. analyt. Chem. **138**, 332 (1953).
[7] *J. Kinnunen* und *B. Merikanto*, Chemist-Analyst **41**, 76 (1952).
[8] *F. Feigl*, Qualitative Analyse mit Hilfe von Tüpfelreaktionen, S. 338ff. Leipzig: Akademische Verlagsges. 1931. Dortselbst weitere Literaturangaben.
[9] Privatmitteilung.
[10] *W. Pilz*, Mh. Chem. **83**, 1291 (1952).
[11] *H. Flaschka*, Mikrochem. **39**, 38 (1952).

Laboratoire de Recherches micro-analytiques de l'Ecole nationale supérieure de Chimie. 11, Rue Pierre Curie, Paris, 5.

Un nouveau projecteur à usages multiples.

Par

Roger Dupuis*.

Avec 5 Figures.

(Reçu le 24 juillet 1953.)

Dans certaines de ses parties cet appareil très simple et facile à manipuler, n'est qu'une application à la projection sur écran de la loupe polarisante précédemment décrite[1].

Description.

Ce projecteur se dédouble, en réalité, en deux instruments indépendants qui sont, d'une part, un projecteur en lumière polarisée, d'autre part, un microprojecteur en lumière ordinaire.

Ces deux appareils ont un organe commun qui est la source lumineuse.

Boîte à lumière. Cet organe qui tient lieu de socle à l'ensemble de l'instrument, est monté sur quatre pieds en caoutchouc afin d'amortir la transmission des vibrations.

Il peut être à base rectangulaire ou carrée selon qu'il contient ou non un transformateur d'alimentation. Cette boîte comporte toujours une ampoule 6 volts-5 ou 10 ampères, à filament ponctuel L et calotte sphérique métallisée, un condensateur optique C et une plaque porte-platine P formant chicane de ventilation (Fig. 1). Le transformateur d'alimentation est du modèle 110—220 volts/6 volts, 5 ou 10 ampères. Sur la plaque porte-platine, peut venir s'encastrer et s'immobiliser l'une des deux platines dont la description suit.

Platine polarisante. Nous retrouvons ici, avec ses accessoires, l'appareil de polarisation proprement dit de la loupe polarisante, très légèrement

* Adresse actuelle: Civry la Forêt, par Orvilliers (Seine et Oise), France.

modifié en ce sens que la tête portant l'analyseur est double et possède la forme d'un huit. Une boucle de ce chiffre porte l'analyseur que nous connaissons, l'autre boucle étant un simple support d'objectif destiné à permettre la projection des phénomènes dus à la réfraction et au pléochroïsme.

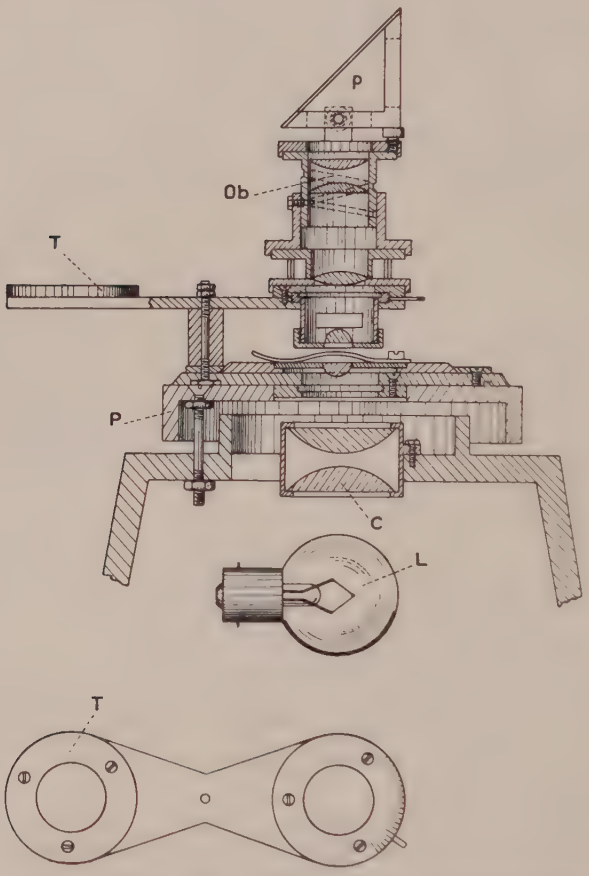


Fig. 1. Schéma du microprojecteur avec platine pour lumière polarisée parallèle ou convergente.

Cette platine est complétée par un objectif périscopique Ob réglable, donnant un grossissement de x 26 par mètre de distance de projection et que vient coiffer un prisme à réflexion totale *p*, mobile dans deux plans perpendiculaires afin d'assurer un centrage immédiat et parfait de l'image sur l'écran.

Ce dispositif permet la projection en lumière polarisée (un nicol) ou en lumière polarisée parallèle (Fig. 2) (deux nicols croisés ou

parallèles ou dans tout autre position intermédiaire), enfin, en lumière polarisée convergente (Fig. 3) (deux nicols croisés ou parallèles, etc.).

Avec une puissance de 30 watts, la distance convenable de projection est de trois mètres, donc suffisante dans la plupart des cas pour le professeur placé entre la table et le tableau noir ou l'écran. A cette distance et en lumière parallèle, l'image couvre un écran de 1,50 m de diamètre environ; en lumière convergente, les figures d'interférence montrent un diamètre compris entre 60 et 90 cm. La projection peut se faire par réflexion ou par transmission et l'écran peut porter éventuellement un réticule.

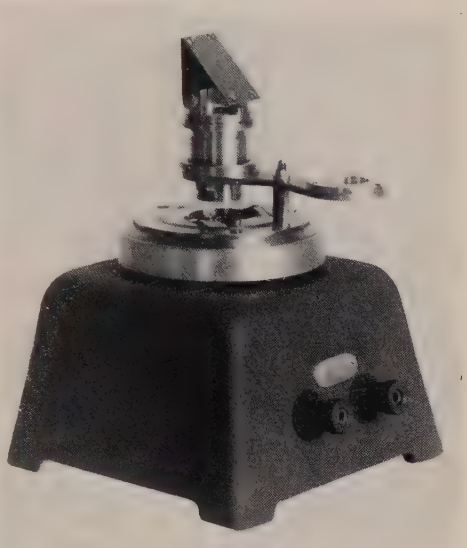


Fig. 2. Photographie de l'appareil pour projection en lumière polarisée parallèle. Socle sans transformateur.

Platine pour microprojection. Cette platine (Fig. 4 et 5) en deux pièces assemblées est formée d'une embase et d'une sorte de pont large et très aplati K sous lequel on introduit les objets à projeter; ce pont servant d'ailleurs de support à l'objectif utilisé, laisse passer les lames porte-objet de dimensions habituelles. Comme dans le cas précédent, l'objectif Ob sera surmonté du prisme p à réflexion totale décrit plus haut.

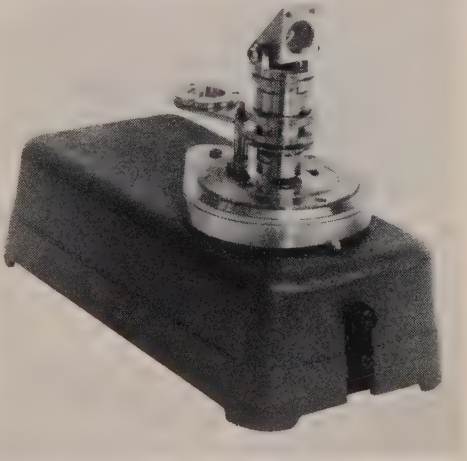


Fig. 3. Photographie de l'appareil pour projection en lumière polarisée convergente. Socle avec transformateur.

Du fait de l'absence de polariseur, l'intensité lumineuse se trouvera accrue de 68%, ce qui permettra d'allonger la distance de projection et, par conséquent, d'augmenter le grossissement. De plus, cette platine

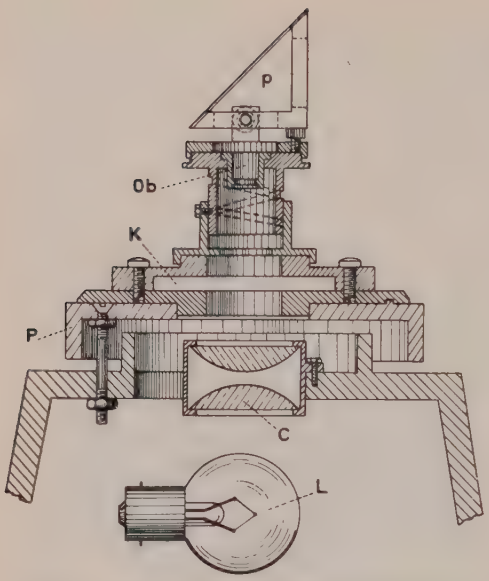


Fig. 4. Schéma de la platine pour microprojection.

Fig. 5. Appareil pour microprojection. Socle avec transformateur.

est accompagnée de l'objectif périscopique cité plus haut et de deux objectifs aplanétiques supplémentaires, ces objectifs ayant respectivement par mètre de distance de projection, les grossissements suivants:

$\times$ 26 $\times$ 40 $\times$ 75.

Avec une puissance de 30 watts, on obtient des grossissements allant jusqu'à $\times$ 300 pour une distance de projection de 4 mètres.

Avec une puissance de 60 watts, on obtient des grossissements dépassant $\times$ 500 pour une distance de projection de 7 mètres. Ce dispositif est plus spécialement destiné à la projection de n'importe quelles préparations microscopiques transparentes: formation de cristaux sur lamelle porteobjet, formation de réactions colorées à la goutte sur lamelle de cellophane ou gélatine, etc. Equipé avec l'objectif faible ($\times$ 26), il convient également à la projection de photographies diapositives tant en couleur qu'en noir, de formats 8 mm, 9,5 mm et, à la rigueur, 16 mm.

L'encombrement de ce projecteur (Fig. 5) à usages multiples, monté sur boîte à lumière avec transformateur est de:

longueur: 30 cm,
largeur: 15 cm,
hauteur: 22 cm.

Son poids est 4 kg environ.

Résumé.

On décrit un appareil petit, léger, robuste, commode à manipuler, permettant d'effectuer la projection de toutes les observations classiques en lumière transmise, polarisée, parallèle et convergente et utilisable également pour la microprojection et la projection fixe de films.

Zusammenfassung.

Ein handlicher, kleiner, leichter, aber widerstandsfähiger Apparat wird beschrieben, der sich zur Projektion mikroskopischer Objekte im durchfallenden, polarisierten, parallelen und konvergenten Licht wie auch zur Projektion von Diapositiven eignet.

Summary.

A description is given of a small apparatus, which is light, sturdy, easy to manipulate. It permits the projection of all classical observations in transmitted, polarized, parallel, and convergent light. It is useful likewise for microprojection and the fixed projection of films,

Bibliographie.

[1] *R. Dupuis*, Mikrochem. **40**, 400 (1953).

Aus dem II. Chemischen Universitätslaboratorium Wien und dem Chemischen Laboratorium der Geologischen Bundesanstalt Wien.

Nachweis und Bestimmung von Hydroxylamin mit 8-Oxy-chinolin.

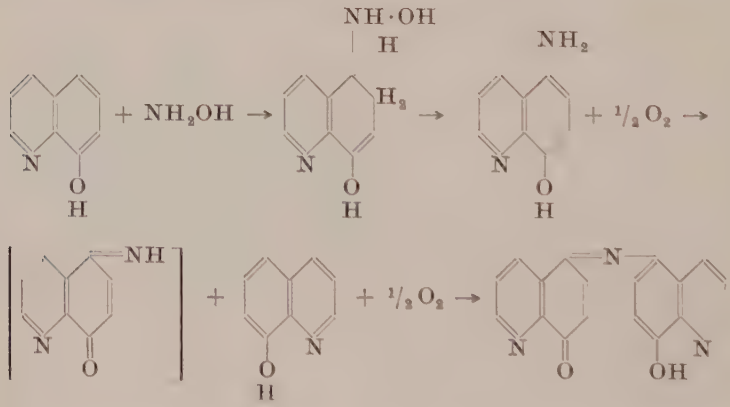
Von

Wilhelm Prodinger und **Oskar Svoboda.**

(Eingelangt am 2. Oktober 1953.)

I. Allgemeine Ergebnisse und Grundlagen.

Hydroxylamin lagert sich in soda-alkalischer Lösung an 8-Oxy-chinolin in 5-Stellung an[1]. Aus dem Anlagerungsprodukt entsteht durch intramolekulare Reduktion 5-Amino-8-oxy-chinolin, das in Gegenwart von überschüssigem 8-Oxy-chinolin durch Luftsauerstoff zu Chinolin-chinon-(5,8)-[8-oxy-chinolyl-5-imid]-(5) oxydiert wird, das die Reaktionslösung grün färbt.



Da die Umsetzung des 5-Amino-8-oxy-chinolins analog der Bildung von Indophenolderivaten[2] verläuft, wurde für das Reaktionsprodukt die Bezeichnung „Indo-oxin" gewählt.

Die Grünfärbung läßt sich nach *Berg* und *Becker*[1] sehr gut für einen hochempfindlichen Nachweis von Hydroxylamin verwenden. Infolge

der von den Autoren angegebenen hohen Empfindlichkeit (pD = 7,1) schien uns die Reaktion für eine photokolorimetrische Bestimmung kleiner Mengen Hydroxylamin geeignet, zumal sie, wie wir in Übereinstimmung mit *Berg* und *Becker* feststellten, auch durch großen Überschuß von Ammoniumsalzen nicht gestört wird. Erst bei einem etwa 1000fachen Überschuß von Ammoniumsalzen tritt eine Störung der Reaktion ein.

Die Bildung des Indo-oxins verläuft nach obigem Schema in zwei Stufen. Die Anlagerung von Hydroxylamin an 8-Oxy-chinolin und die Umlagerung zum 5-Amino-8-oxy-chinolin gehen ziemlich langsam vor sich, die Kupplung zum Indo-oxin hingegen verläuft sehr rasch, was wir bei der Kondensation von 5-Amino-8-oxy-chinolin mit 8-Oxy-chinolin feststellen konnten.

Es war von vornherein zu erwarten, daß die Reaktion stark p_H-abhängig sein werde. Unsere diesbezüglichen Versuche ergaben denn auch, daß die Bildung von Indo-oxin erst bei einem p_H-Wert von 10,00 einsetzt, ein Maximum bei $p_H = 11{,}50$ erreicht und bei noch höheren p_H-Werten wieder absinkt.

Nun ist aber nicht nur die Reaktion, sondern auch die Farbe der Indo-oxin-lösung vom p_H-Wert abhängig, da Indo-oxin, wie schon *Berg* und *Becker* fanden, deutliche Indikatoreigenschaften besitzt; alkalische Lösungen sind grün, saure rot. Um also vergleichbare Färbungen zu erhalten, ist der Zusatz eines geeigneten Puffers erforderlich. Wir verwendeten den Glykokoll-Natronlaugepuffer nach *Sörensen*.

Die Reproduzierbarkeit der Messungen hängt schließlich von der Art der Sauerstoffzufuhr ab. Es ist nicht angängig, die Oxydation durch Einleiten von Luft durchzuführen, da hierbei unkontrollierbare Verluste von 8-Oxy-chinolin entstehen. Das Einleiten von Luft ist auch nicht nötig, es genügt, die Lösungen zu Beginn der Reaktion durch kräftiges Schütteln mit Luft zu sättigen.

Mittels der Reaktion lassen sich normalerweise Konzentrationen von 100 μg/ml bis 2 μg/ml gut bestimmen.

Die Abhängigkeit von der Reaktionszeit kommt dadurch zum Ausdruck, daß das *Lambert-Beer*sche Gesetz nur bei gewissen optimalen Reaktionszeiten streng erfüllt ist. Es gelang auch nicht, Bedingungen ausfindig zu machen, bei deren Einhaltung die Kurve über den gesamten Konzentrationsbereich eine Gerade ist, da eben die jeweils optimalen Reaktionszeiten zu verschieden sind. Wohl gelingt es jedoch, innerhalb engerer Bereiche Reaktionszeiten zu wählen, bei deren Einhaltung das *Lambert-Beer*sche Gesetz streng erfüllt, die Kurve also eine Gerade ist.

Im Konzentrationsbereich von 2 bis 10 μg Hydroxylamin/ml beträgt die optimale Reaktionszeit 4 Stunden, im Bereich von 20 bis 100 μg Hydroxylamin/ml beträgt sie 1 Stunde.

Im Bereich von 0,2 bis 1 μg Hydroxylamin/ml gelang es nicht, die ganze Kurve als Gerade zu erhalten; die Kurve ist von 0.2 μg bis etwa 0,5 μg Hydroxylamin/ml gekrümmt und geht erst dann in eine Gerade über. Die untere Grenze, bei der man noch gut reproduzierbare Werte erhält, liegt bei normaler Ausführung bei 1 μg/ml. Man kann allerdings die Empfindlichkeit der Methode noch steigern, wenn man eine Anreicherung des gebildeten Indo-oxins vornimmt. Man säuert dazu nach der Bildung von Indo-oxin-Natrium mit alkoholischer Essigsäure an und extrahiert das in Freiheit gesetzte Indo-oxin mit Chloroform. (Mit Mineralsäuren anzusäuern, ist nicht möglich, da die betreffenden Salze in organischen Lösungsmitteln praktisch nicht löslich sind.) Auf diese Art gelingt es, die Empfindlichkeit bis pD = 7.3 zu steigern. Die kleinste, noch bestimmbare Menge beträgt 0,2 μg Hydroxylamin/ml.

Als obere Grenze fanden wir die Konzentration von 100 μg/ml, einerseits wegen der hohen Reaktionsgeschwindigkeit und hauptsächlich infolge der Schwerlöslichkeit des Indo-oxin-Natriums, das sich bei höheren Konzentrationen bereits nach einigen Minuten in Form von braunen Kristallen abscheidet.

Die zu analysierenden Lösungen müssen annähernd neutral sein. Stark saure Lösungen neutralisiert man am besten mit Natriumhydrogencarbonat, muß aber vor Zusatz der Reagenzien das entstandene Kohlendioxyd durch anhaltendes Kochen aus der Lösung entfernen, da bei Anwesenheit von Kohlendioxyd der für die Reaktion optimale p_H-Wert nicht erreicht wird. Es ist auch vorteilhaft, möglichst ungepufferte Lösungen zu analysieren, da man im gegenteiligen Falle nicht den für die Bestimmung richtigen p_H-Wert einstellen kann.

Nötigenfalls müßten diese schon vorhandenen Puffersysteme vor der Bestimmung ausgefällt oder zerstört werden.

Da Indo-oxin ein typischer Innerkomplexbildner ist, müssen mit Ausnahme der Alkalimetalle alle anderen Metalle vor der Bestimmung entfernt werden.

Bei Serienbestimmungen kann sich unter Umständen die Abhängigkeit von der Reaktionszeit dadurch unangenehm bemerkbar machen, daß es dann unmöglich ist, bei allen Proben die gleiche Zeit einzuhalten. Man kann diese Unbequemlichkeit jedoch dadurch umgehen, daß man die Reaktion nach einer gewissen Zeit unterbricht, was am einfachsten durch Ansäuern mit alkoholischer Essigsäure zu erreichen ist. In der schwach sauren Lösung findet keine Reaktion statt; da solche Lösungen während 4 Stunden vollkommen beständig sind, ist auf diese Weise die Durchführung von Serienbestimmungen möglich.

Diese Unterbrechung der Reaktion ist hauptsächlich bei Konzentrationen von 20 bis 100 μg Hydroxylamin/ml erforderlich, da bei Konzentrationen von 2 bis 10 μg/ml die Reaktionsgeschwindigkeit

wesentlich geringer ist. Man kann also bei diesen Konzentrationen die alkalischen grünen Lösungen zur Messung heranziehen. Die Beständigkeit dieser Lösungen beträgt bis zu 24 Stunden.

Die Methode schien uns zur Analyse von Oximen, Oximsäuren oder ähnlichen Verbindungen geeignet. Wir haben deshalb die Verseifung von Cyclohexanon-oxim eingehender untersucht und dabei gefunden, daß die Methode zwar nicht zur Reinheitsprüfung von Oximen, wohl aber z. B. zur Entscheidung gewisser konstitutioneller Fragen geeignet erscheint. Das wird besonders dann der Fall sein, wenn nur so wenig Ausgangsmaterial vorliegt, daß die bei der Verseifung entstandenen Mengen Hydroxylamin durch die üblichen Methoden nicht mehr erfaßt werden können.

Berücksichtigt werden muß natürlich in jedem einzelnen Falle, daß die Konzentration der zur Verseifung nötigen Säure und die Dauer des Erhitzens in Extremfällen auf die Bestimmung einen ungünstigen Einfluß ausüben können.

Da die Bestimmung, je nach den angewendeten Mengen Oxim, einige Stunden benötigt, ist es natürlich nicht möglich, die verseiften Lösungen direkt zu messen. Vielmehr muß man die organischen Spaltstücke vor der Messung wegen der Gefahr der Rückbildung des Oxims durch Extraktion mit unpolaren Lösungsmitteln entfernen. Die übliche Verwendung von Äther empfiehlt sich jedoch nicht, da bei Anwendung von peroxydhaltigem Äther ein zu geringer Gehalt von Hydroxylamin vorgetäuscht würde. Aber auch bei Anwendung peroxydfreien Äthers erhält man nur dann richtige Resultate, wenn man die Verseifung in einer inerten Atmosphäre durchführt. Wir verwendeten daher zur Extraktion Benzol und erhielten damit befriedigende Resultate.

Zur Verseifung diente Salzsäure statt der sonst üblichen Schwefelsäure, weil der Glykokoll-Natronlauge-Puffer zur Entfernung von Carbonat meistens mit Bariumchlorid versetzt ist und eine durch Bariumsulfat getrübte Lösung zur Messung ungeeignet ist.

Es war noch festzustellen, ob Hydroxylamin durch Kochen mit Salzsäure eine Zersetzung erleidet. Wir haben bei unseren diesbezüglichen Versuchen festgestellt, daß 1 ml Hydroxylammoniumchloridlösung (entsprechend 8,6 μg Hydroxylamin/ml) mit 5 ml 1-n Salzsäure unbedenklich 1 Stunde gekocht werden kann. Erst nach $1^1/_2$stündigem Kochen läßt sich eine merkbare Abnahme des Hydroxylamingehaltes feststellen.

II. Beschreibung der Versuche.

1. Der qualitative Nachweis von Hydroxylamin.

Für diesen Nachweis geben *Berg* und *Becker*[1] folgende Vorschrift an:

Zu 1 ml einer 1%igen alkoholischen Oxinlösung gibt man 1 ml der zu untersuchenden schwach salzsauren Lösung, macht mit 1 ml 2-n Natrium-

carbonatlösung alkalisch und schüttelt kräftig durch. Je nach der Menge des Hydroxylamins tritt sofort oder erst nach einigem Stehenlassen eine Grünfärbung ein. Bei großen Mengen kann sich mit der Zeit ein brauner, glänzender Niederschlag des Natrium-indo-oxinats bilden.

Zur Feststellung des störenden Einflusses von Ammoniumsalzen haben wir folgende Lösungen nach obiger Vorschrift untersucht:

207 μg NH_2OH/ml + 200 μg NH_3/ml,
41 „ „ + 200 „ „ „
4,1 „ „ + 200 „ „ „
0,41 „ „ + 200 „ „ „

Bei allen diesen Konzentrationsverhältnissen konnte keinerlei Störung gegenüber den Vergleichslösungen ohne Ammoniumsalzzusatz festgestellt werden. Erst bei wesentlich höheren Ammoniumsalzmengen tritt eine merkbare Verzögerung der Reaktion ein: 207 μg NH_2OH/ml + 20 mg NH_3/ml reagierten erst nach 24 Stunden. Erhöhte man die Konzentration der Ammoniumsalze noch weiter, z. B. auf je 4,1 bzw. 0,4 μg NH_2OH/ml 20, 12 bzw. 4 mg NH_3/ml, so erhielt man in allen Fällen nach 5 Stunden Lösungen, die eine schwache Rosafärbung aufwiesen, die am folgenden Tag in ein tiefes Orangerot verstärkt war.

2. Photometrische Hydroxylaminbestimmung mit dem Mikrophotometer nach *Krumholz*.

Verwendete Lösungen:

Die Hydroxylammoniumsalzlösungen wurden aus reinen, aus Alkohol umkristallisierten Salzen hergestellt. Der Gehalt wurde nach *Raschig*[3] festgestellt; dann wurden durch exaktes Verdünnen Lösungen mit 10 bzw. 100 μg NH_2OH/ml bereitet.

Die Reagenslösung wurde aus im Vakuum sublimiertem 8-Oxychinolin durch Lösen von 2,000 g in 500 ml 50%igen Alkohols bereitet. Zur Vermeidung von Verlusten durch Sublimation ist es angezeigt, die Lösung nur bei Zimmertemperatur zu bereiten. Unter Lichtabschluß aufbewahrt, ist sie lange Zeit beständig.

Die Pufferlösung wurde aus Glykokoll (nach *Sörensen*) und carbonatfreier 0,1-n Natronlauge hergestellt und ihr p_H-Wert durch Messung mit einer Spezial-Glaselektrode (Polymetron, Zürich) überprüft.

Die verwendete Essigsäure stellten wir durch Lösen von 6,00 ml Eisessig (99%ig) in einem Gemisch von 300 ml Alkohol und 100 ml Wasser her.

Zur Ermittlung des optimalen p_H-Wertes der Reaktionslösung haben wir die Extinktion gleich konzentrierter Lösungen bei verschiedenen p_H-Werten gemessen:

Je 5 ml Hydroxylaminsalzlösung (10 μg NH_2OH/ml) wurden mit 1 ml 0,4%iger Oxychinolinlösung und 5 ml Pufferlösung versetzt, das Gemisch 10 Minuten auf dem Wasserbad stehengelassen, auf 20 ml aufgefüllt und anschließend die Extinktion gemessen.

pH-Wert	$E \cdot 10^3$
9,50	46
10,00	108
10,50	342
11,00	357
11,50	367
11,55	314
11,60	310
11,65	276
11,70	260
11,75	280

Auf Grund der in der Dissertation des einen[4] von uns ausführlich beschriebenen Messungen können wir folgende allgemeine *Arbeitsvorschrift* geben:

5 ml der zu untersuchenden Lösung werden in einem 20-ml-Meßkolben mit 2 ml 2%iger Oxinlösung versetzt und nach Zusatz von 3 ml Pufferlösung 30 Sekunden kräftig geschüttelt. Sodann läßt man den Kolben verschlossen die jeweils günstigste Reaktionszeit stehen. Vor der Messung wird, wenn nötig, mit 50%igem Alkohol auf 20 ml aufgefüllt.

Wie schon erwähnt, richtet sich die Einhaltung der Reaktionszeit nach dem Gehalt der zu untersuchenden Lösung. Zur annähernden Messung vor der eigentlichen Bestimmung geht man am besten folgendermaßen vor: Man versetzt 5 ml Probelösung mit 3 ml Reagenslösung und 3 ml Pufferlösung. Nach kurzem Durchschütteln wird unter Verwendung des Rotfilters nach 10 Minuten gemessen. Extinktionswerte zwischen 0,40 und 0,17 zeigen Konzentrationen von etwa 20 bis 100 μg NH_2OH/ml, solche zwischen 0,11 und 0,03 Konzentrationen von 2 bis 10 μg NH_2OH/ml und solche unter 0,03 Konzentrationen unter 2 μg NH_2OH/ml an.

Bei Mengen von 2 bis 10 μg NH_2OH/ml erhält man nur dann Werte, die das *Lambert-Beer*sche Gesetz erfüllen, wenn man die Messung nach 4 Stunden Reaktionszeit durchführt. Man kann bei diesen Konzentrationen auch ohne Auffüllen auf 20 ml Werte erhalten, die auf einer Geraden liegen. Bei dieser Arbeitsweise hat die Eichgerade einen steileren Anstieg, was für die Genauigkeit der Ablesungen günstig ist.

Bei Konzentrationen von 20 bis 100 μg NH_2OH/ml ist bei Einhaltung der allgemeinen Vorschrift das *Lambert-Beer*sche Gesetz ganz gut erfüllt, nur ändert sich die Extinktion sehr rasch mit der Zeit. Diesem Übelstande läßt sich dadurch sehr leicht begegnen, daß man die Reaktion nach 1 Stunde durch Zusatz von Essigsäure unterbricht und die rote Lösung mißt.

Zu beachten ist hier, daß die Rotfärbung in stärker sauren Lösungen nicht sehr lange beständig ist. Setzt man aber nicht mehr Essigsäure zu, als zur Neutralisation unbedingt erforderlich ist, so erhält man auf einer Geraden liegende Werte, die während 4 Stunden konstant bleiben. Da Indo-oxin ein Indikator ist, gelingt es leicht, nicht mehr als die zur

Neutralisation nötige Menge Essigsäure zu verwenden. Folgende *Arbeitsvorschrift* hat sich als günstig erwiesen:

5 ml Probelösung werden mit 2 ml Reagenslösung und 3 ml Pufferlösung versetzt und 30 Sekunden kräftig geschüttelt. Nach einstündigem Stehen versetzt man mit 0,6 ml Essigsäure, füllt auf 20 ml auf und mißt unter Verwendung eines Grünfilters.

Bei Konzentrationen von 0,2 bis 1,0 μg NH_2OH/ml wurden bei der gewöhnlichen Arbeitsweise nur Werte erhalten, die sich sehr wenig von $E = 0$ unterschieden, wiewohl die Reaktionszeit bis auf 14 Stunden erhöht wurde. Erst nach 22stündiger Reaktionszeit wurden Werte erhalten, die brauchbarer waren. Da die daraus abgeleitete Eichkurve sehr flach und außerdem stark gekrümmt war, versuchten wir, die Löslichkeit des Indo-oxins in organischen Lösungsmitteln zur Anreicherung heranzuziehen. Dies gelang auch mit Chloroform.

Als Reaktionszeit mußten wir allerdings 15 Stunden belassen. Unter Berücksichtigung der oben geschilderten Schwierigkeiten ergibt sich folgende Vorschrift: 10 ml Probelösung werden mit 2 ml Reagenslösung und 2 ml Pufferlösung versetzt, gut durchgeschüttelt und 15 Stunden (am bequemsten über Nacht) reagieren gelassen. Man unterschichtet am nächsten Tage mit 3 ml Chloroform, versetzt mit 0,5 ml Essigsäure und schüttelt gut durch. Nach Absetzen der Schichten trennt man die Chloroformschicht ab und mißt unter Verwendung des Grünfilters.

3. Bestimmung des Hydroxylamins bei der Verseifung von Cyclohexanonoxim.

Wir verfuhren nach folgender Vorschrift: Die Einwaage an Cyclohexanonoxim (zirka 0,3 mg) wurde mit 5 ml 1-n Salzsäure 1 Stunde unter Rückfluß gekocht. Nach raschem Abkühlen wurde mit der zur Neutralisation berechneten Menge 1-n Natriumhydrogencarbonatlösung versetzt, das Kohlendioxyd durch 10 Minuten dauerndes Kochen vertrieben, die abgekühlte Lösung 30 Minuten in einem Mikro-Extraktor mit Benzol extrahiert und die vom Benzol befreite wäßrige Lösung nach der oben gegebenen Vorschrift gemessen.

Über die erzielbare Genauigkeit unterrichten nachstehende Daten:

Einwaage μg	Entsprechend μg NH_2OH ml	$E \cdot 10^3$	Gefunden μg NH_2OH ml	Verseiftes Cyclohexanonoxim in %
263	7,7	328	7,6	98,8
234	6,8	312	7,0	102,8

Zusammenfassung.

Die von *Berg* und *Becker* angegebene Nachweisreaktion für Hydroxylamin mit Oxin wurde zu einer photometrischen Bestimmung von

Hydroxylaminmengen von 100 bis 0,2 μg ausgearbeitet. Die Reaktion beginnt bei $p_H = 10{,}00$ und erreicht bei $p_H = 11{,}50$ ein Maximum. Ammoniumsalze stören erst bei etwa 1000fachem Überschuß. Die Bestimmung des bei der Verseifung von Cyclohexanonoxim entstehenden Hydroxylamins wird beschrieben.

Summary.

The method given by *Berg* and *Becker* for the detection of hydroxylamine with oxine was developed into a photometric method of determining quantities of hydroxylamine of the order of 100 to 0.2 μg. The reaction begins at $p_H = 10.00$ and reaches a maximum at 11.50. Ammonium salts interfere only at about 1000fold excess. — A description is given of the determination of the hydroxylamine produced when cyclohexanone oxime is saponified.

Résumé.

La réaction permettant, d'après *Berg* et *Becker* de rechercher l'hydroxylamine par l'oxine, a été utilisée pour doser des quantités d'hydroxylamine allant de 100 à 0,2 μg. La réaction commence vers p_H 10,00 et passe par un maximum à 11,50. Les sels d'ammonium ne troublent qu'à partir d'un excès de 1000 fois. On décrit le dosage de l'hydroxylamine formée par saponification de la cyclohexanone-oxime.

Literatur.

[1] *R. Berg* und *E. Becker*, Ber. dtsch. chem. Ges. **73**, 172 (1940).
[2] *G. Heller*, Ann. Chem. **392**, 16 (1912).
[3] Vgl. *W. Prodinger* und *G. Schwieder*, Z. analyt. Chem. **130**, 29 (1949).
[4] *O. Svoboda*, Untersuchungen über das Indo-oxin. Dissertation Wien, 1953.

Aus dem Medizinisch-chemischen Institut und Pregl-Laboratorium der Universität Graz.

Mikrobestimmung von Carbonylgruppen mit nitrosubstituierten Phenylhydrazinen.

Von

W. Schöniger, H. Lieb und K. Gassner.

Mit 1 Abbildung.

(Eingelangt am 29. Juli 1953.)

Für die Bestimmung von Carbonylgruppen in organischen Verbindungen sind zahlreiche Verfahren angegeben worden, die durchwegs auf der Eigenschaft der Carbonylgruppen beruhen, mit Sulfiten, Aminen oder Hydrazinderivaten Anlagerungsverbindungen bzw. Kondensationsprodukte zu liefern. Nach der jeweils angewandten Methodik können die in der Literatur beschriebenen Verfahren in folgende Gruppen eingeteilt werden:

1. Methoden, die auf der gravimetrischen Bestimmung der Reaktionsprodukte beruhen[1–9].

2. Methoden, die auf der Bestimmung des Reagensüberschusses beruhen. Dabei kann noch eine Unterteilung unter Berücksichtigung des zur Verwendung gelangenden Reagens getroffen werden. So wenden einzelne Autoren Natriumhydrogensulfit[10,11], andere Phenylhydrazin[12–19] oder Hydroxylamin[20] an.

3. Methoden, die auf der Bestimmung von Reaktionsnebenprodukten beruhen. Dabei wird entweder die bei der Umsetzung der carbonylgruppenhaltigen Verbindung mit Hydroxylaminchlorhydrat freiwerdende Menge Säure[21–31] oder das bei der Umsetzung mit Anilin in Gegenwart von Aluminiumchlorid[32,33] bzw. das bei der Reaktion mit Hydroxylaminchlorhydrat[34] freiwerdende Wasser quantitativ erfaßt.

4. Schließlich sind auch einige Methoden zu erwähnen, die auf einer indirekten Bestimmung des Reaktionsproduktes beruhen, wie z. B. durch Ermittlung des Hydrazinstickstoffes der Hydrazone[35] oder des aus Semicarbazonen gebildeten Ammoniaks[36,37].

Fast alle Methoden sind nur auf bestimmte Gruppen carbonylhaltiger Verbindungen beschränkt und nur wenige davon sind für kleine Substanzmengen ausgearbeitet. Lediglich die Methode von *Strache-Falkenhausen*[17] ist als Mikromethode allgemeiner anwendbar. Über ihre Grenzen bzw. die ihr anhaftenden Mängel wurde bereits berichtet[18].

Zwecks Ausarbeitung einer allgemein anwendbaren Methode ging unser Bestreben dahin, durch Verwendung verschiedener substituierter Phenylhydrazine die Hydrazonbildung bei einer möglichst großen Zahl verschiedenartiger Carbonylverbindungen zu untersuchen und festzustellen, bei welchen Gruppen und unter welchen Bedingungen die Hydrazonbildung quantitativ verläuft. In den Fällen, in denen die Hydrazonbildung nicht quantitativ verläuft, sollte die Bestimmung der Carbonylgruppen auf indirektem Weg durch Bestimmung des Stickstoffes in den isolierten Hydrazonen vorgenommen werden. Über die von uns ausgearbeitete Methode zur Carbonylgruppenbestimmung mit kleinen Substanzmengen unter Verwendung von 2,4-Dinitrophenylhydrazin wurde bereits in einer vorläufigen Mitteilung berichtet[18]. Im folgenden wird nun die genaue Arbeitsvorschrift gegeben.

I. Die direkte Bestimmung von Carbonylgruppen.

Prinzip: Die zu untersuchende Substanz wird mit einem Überschuß einer 2,4-Dinitrophenylhydrazinlösung bekannten Gehaltes zur Reaktion gebracht. Nach quantitativer Abtrennung des entstandenen Dinitrophenylhydrazons wird das überschüssige 2,4-Dinitrophenylhydrazin mit Titantrichlorid zu der entsprechenden Diaminoverbindung reduziert und das nicht oxydierte Titantrichlorid mit einer Eisen-III-Ammoniumsulfatlösung quantitativ erfaßt. Zur vollständigen Reduktion werden für 1 Mol 2,4-Dinitrophenylhydrazin 12 Äquivalente Titantrichlorid verbraucht.

Reagenzien.

4-Nitrophenylhydrazin (Fp. 156° C),
2,4-Dinitrophenylhydrazin (Fp. 198° C),
2,4,6-Trinitrophenylhydrazin (Fp. 182° C).

Die für die Herstellung einer ungefähr 0,01-m Lösung notwendige Menge (0,15 bis 0,25 g) des entsprechenden Nitrophenylhydrazins wurde in 100 ml 2-n Salzsäure gelöst. (Größere Mengen an Reagenslösung herzustellen ist nicht zu empfehlen, da die Lösungen nur eine Woche haltbar sind.)

Titantrichloridlösung. 500 ml 10%ige Salzsäure werden zum Sieden erhitzt, um gelösten Sauerstoff zu entfernen. Man setzt dann ungefähr 280 ml 20%iger Titantrichloridlösung zu und verdünnt mit ausgekochtem dest. Wasser auf 1000 ml. Die fertige, etwa 6,5%ige Lösung soll unter Stickstoff aufbewahrt werden.

0,05-n Eisen-III-Ammoniumsulfatlösung. Der Faktor wird in der üblichen Weise jodometrisch bestimmt.

Ammoniumrhodanidlösung, 10%ig, als Indikator.

Salzsäure-Flußsäure-Gemisch. 150 ml konz. Salzsäure werden mit 10 ml 40%iger Flußsäure versetzt. Das Gemisch muß in einer paraffinierten Flasche aufbewahrt werden.

2-n Salzsäure als Waschflüssigkeit.

Lösungsmittel. Als solche werden mit Wasser mischbare, wie Methylalkohol, Äthylalkohol, Dioxan, Tetrahydrofuran und Pyridin verwendet.

Stickstoff in Stahlflaschen des Handels.

Apparat.

Der Apparat (Abb. 1) besteht aus Jenaer Geräteglas. Das Titrationskölbchen *A* mit einem Fassungsraum von 100 ml trägt eine Schliffkappe, die ihrerseits mit zwei kleinen Normalschliffen I und II versehen ist. An den einen (I) ist ein Kapillarrohr *B* so angeschmolzen, daß es 3 bis 4 mm über dem Boden des Kölbchens endet. Der Glasfrittentiegel *C* mit einer G 4 Fritte ist ebenfalls mit einem Schliffansatz versehen. Das Winkelrohr *D* dient einmal zum Anschließen des Gerätes an die Wasserstrahlpumpe, das andere Mal zum Einleiten von Stickstoff während der Titration. Es ist empfehlenswert, für die Titration einen Magnetrührer zu verwenden. Falls dieser nicht vorhanden ist, kann das Kapillarrohr *B* unten etwas abgebogen werden, so daß der Stickstoff die Durchmischung besorgt.

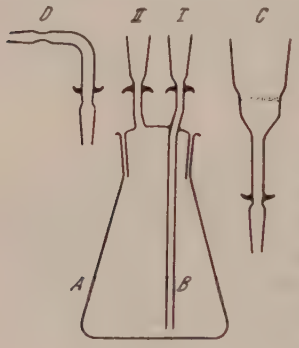


Abb. 1.

Ausführung der Bestimmung.

2 bis 5 mg fester Substanz werden wie üblich mit einem Wägestäbchen in ein Erlenmeyer-Kölbchen von 25 bis 50 ml Inhalt eingewogen. Man gibt 2 ml eines mit Wasser mischbaren, die Substanz gut lösenden Lösungsmittels zu und erwärmt, falls nötig. Flüssige Substanzen werden nach *Pregl* in einer Kapillare eingewogen und diese, nachdem man das Lösungsmittel in das Kölbchen gegeben hat, mit einem Glasstab unter der Flüssigkeit zerdrückt. Der Glasstab wird dann mit möglichst wenig 2-n Salzsäure abgespült. Man setzt mit einer geeichten Pipette 5 ml Nitrophenylhydrazinlösung zu und läßt das Gemisch 12 Stunden, am besten über Nacht, bei niedriger Temperatur stehen. Bei Substanzen, deren chemische Natur vollkommen unbekannt ist, ist es empfehlenswert, mehrere Einwaagen verschieden lange Zeit mit der Nitrophenylhydrazinlösung reagieren zu lassen.

Nachdem die quantitative Umsetzung zum Hydrazon erfolgt ist, wird die überschüssige Nitrophenylhydrazinlösung mittels des Schliffkölbchens abgesaugt. Auf das mit Chromsäure-Schwefelsäure und dest. Wasser gereinigte und getrocknete Kölbchen wird die Schliffkappe, nachdem man sie hauchfein gefettet hat, aufgesetzt. Der Glasfrittentiegel *C* wird in den Schliffkonus I, das Winkelrohr *D* in den Schliffkonus II eingesetzt und mit einer Wasserstrahlpumpe verbunden. Man gießt nun das Reaktionsgemisch auf und saugt vom gebildeten Nitrophenylhydrazon ab. Das Kölbchen und der Glasfrittentiegel werden mit möglichst wenig (3 bis 5 ml) 2-n Salzsäure quantitativ ausgespült.

Man nimmt nun den Glasfrittentiegel ab und setzt das Winkelrohr, dessen Verbindung mit der Wasserstrahlpumpe unterbrochen wurde, in den Schliffkonus I. Mit dieser Anordnung läßt sich Stickstoff durch die Flüssigkeit leiten. Man stellt das Reduzierventil der Stahlflasche so ein, daß die im Kölbchen aufsteigenden Blasen gerade noch zählbar sind. Jetzt gibt man 2 ml Salzsäure-Flußsäure-Gemisch zu und, nachdem man 5 Minuten lang Stickstoff durchgeleitet hat, mit einer geeichten Pipette 1 ml Titantrichloridlösung. Unter ständigem Durchleiten von Stickstoff wird das Reaktionsgemisch zur vollständigen Reduktion des überschüssigen Nitrophenylhydrazins 10 Minuten lang gekocht. Anschließend kühlt man durch Einstellen in Leitungswasser und gibt für die nun folgende Titration 2 ml Ammoniumrhodanidlösung zu.

Zur Titration wird, wenn man magnetisch rührt, der Rührer in die Flüssigkeit eingebracht und unter fortwährendem Durchleiten von Stickstoff das nicht oxydierte Titantrichlorid mit der Eisen-III-Ammoniumsulfatlösung bis zur ersten bleibenden Rosafärbung titriert. Um die Titration bequem durchführen zu können, wird die Spitze der Mikrobürette in den Schliffkonus II eingeführt, der genügend weit dimensioniert sein muß, damit der Stickstoff auch noch entweichen kann.

Vor jeder Serie von Bestimmungen wird mit gleichen Mengen an Reagenslösungen eine *Leerwertbestimmung* in der eben beschriebenen Weise durchgeführt.

Berechnung.

A = ml Verbrauch an Eisen-III-Ammoniumsulfatlösung bei der Bestimmung.
B = ml Verbrauch an Eisen-III-Ammoniumsulfatlösung bei der Leerwertbestimmung.

$$\% \text{ Carbonyl} = \frac{(A - B) \cdot F \cdot N \cdot 100}{\text{mg Substanz}}.$$

4-Nitrophenylhydrazin: $F = 4{,}669$ $\log F = 66926$,

2,4-Dinitrophenylhydrazin: $F = 2{,}335$ $\log F = 36823$,

2,4,6-Trinitrophenylhydrazin: $F = 1{,}556$ $\log F = 19214$.

N = Normalität der Eisen-III-Ammoniumsulfatlösung.

Tabelle 1.

Substanz	mg Einwaage	% Carbonyl		Zahl der CO-Gruppen	
		berechnet	gefunden	berechnet	gefunden
Mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin bestimmt:					
Vanillin	5,040	18,4	19,4	1,00	1,05
	4,104		19,1		1,03
p-Oxybenzaldehyd	4,698	22,9	23,4	1,00	1,02
	3,988		23,1		1,01
Benzoin	3,549	13,2	12,8	1,00	0,97
	3,694		12,6		0,95
Benzophenon	4,720	15,4	14,9	1,00	0,97
	4,395		13,8		0,90
p-Amino-acetophenon	4,115	20,7	19,6	1,00	0,95
	3,785		19,7		0,95
Piperonal	4,790	18,6	17,7	1,00	0,95
	5,670		18,2		0,98
Protocatechualdehyd	2,580	20,3	19,6	1,00	0,97
	4,560		20,5		1,01
Phthal-aldehydsäure	3,942	18,5	17,7	1,00	0,96
	3,995		18,5		1,00
p-Dimethylaminobenzaldehyd	3,705	18,8	18,8	1,00	1,00
	3,160		18,8		1,00
o-Nitrobenzaldehyd	5,230	18,5	18,6	1,00	1,01
	5,193		18,7		1,01
Salicylaldehyd	4,147	22,9	21,6	1,00	0,94
	3,660		21,0		0,92
Zimtaldehyd	5,766	21,2	20,9	1,00	0,99
	4,007		20,5		0,97
Acetophenon	2,185	23,3	23,0	1,00	0,99
	1,158		22,7		0,97
Anhydro-oxyprogesteron	5,030	8,9	8,3	1,00	0,93
	4,253		8,4		0,94
2-Oxy-5-butyl-(tert.)benz-aldehyd	3,887	15,6	14,9	1,00	0,96
	4,048		15,0		0,96
4-Oxymethylacetophenon	2,780	18,6	18,1	1,00	0,97
	2,715		17,9		0,96
4-Acetobenzylchlorid	4,660	16,6	17,0	1,00	1,02
	3,060		16,8		1,01
4-Acetobenzoesäure	3,171	17,1	15,9	1,00	0,93
	3,360		15,7		0,92
Dihydro-α-jonon	3,208	14,4	13,9	1,00	0,97
	3,355		13,3		0,92

(Fortsetzung der Tabelle 1.)

Substanz	mg Einwaage	% Carbonyl		Zahl der CO-Gruppen	
		berechnet	gefunden	berechnet	gefunden
Testosteron	3,260	9,7	9,6	1,00	0,99
	2,870		10,0		1,03
Δ_4-Cholestenon	3,920	7,3	6,4	1,00	0,88
	3,510		6,4		0,88
Carvon	2,915	18,7	18,7	1,00	1,00
	3,135		18,4		0,98
p-Nitrobenzaldehyd	4,200	18,5	18,2	1,00	0,98
	4,394		18,1		0,98
4-Acetophenyldimethyl-essigsäure	3,250	13,6	12,8	1,00	0,94
	3,194		13,2		0,97
d,l-4-Aceto-phenyl-(3)-buttersäure	4,000	13,6	13,3	1,00	0,98
	3,380		13,0		0,96
d,l-4-Aceto-phenyl(3),2-methyl-propionsäure	3,485	13,6	13,9	1,00	1,02
	3,800		13,7		1,01
4-Aceto-phenyl-(5)-n-valeriansäure	3,150	12,7	5,1	1,00	0,40
	2,770		12,8		1,01*
4-Aceto-phenyl-(3)-propionsäure	2,237	14,6	14,8	1,00	1,01*
	1,913		15,4		1,05*
4-tert. Butyl-2,2-diacetoxy-cyclohexadien-on-1	3,848	10,5	11,1	1,00	1,06*
	4,102		11,0		1,05*
4-tert. Amyl-2,2-diacetoxy-cyclohexadien-on-1	3,888	10,0	8,3	1,00	0,83
	3,288		10,0		1,00*
4-Oxy-5-methoxy-phenyl(1)-dodekanon(3)	4,338	9,1	7,9	1,00	0,87
	2,690		8,3		0,91
Benzil	6,260	26,6	12,7	2,00	0,96
	5,225		13,3		1,00
Retenchinon	3,310	21,2	10,1	2,00	0,95
	3,915		10,0		0,94
Dibenzoylmethan	2,149	24,9	12,7	2,00	1,02
	3,677		13,3		1,06
Dibenzoylacetylmethan	3,943	31,6	10,3	3,00	0,98
	4,632		10,3		0,98
Methylcyclopentadiondicarbonsäurediäthylester	3,887	21,8	10,7	2,00	0,98
	3,780		15,7		1,44*
Biliansäure	3,310	12,4	6,1	2,00	0,98
	3,210		6,5		1,07
2-Methyl-2-acetoxy-cyclohexadienon-1	5,605	16,9	6,7	1,00	0,40
	3,420		8,4		0,50
4-Methyl-2,2-diacetoxy-cyclohexadien-on-1	3,617	12,5	6,4	1,00	0,51
	2,720		6,5		0,52

(Fortsetzung der Tabelle 1.)

Substanz	mg Einwaage	% Carbonyl		Zahl der CO-Gruppen	
		berechnet	gefunden	berechnet	gefunden
2,4,6-Trimethyl-4-acetoxy-cyclo-hexadien-on-1	3,080	14,4	9,9	1,00	0,69*
	2,802		10,2		0,71*
4,5-Dimethyl-2,2-diacetoxy-cyclohexadien-on-1	4,114	11,8	7,4	1,00	0,63
	3,060		7,1		0,60
2,4-Dimethyl-2-acetoxy-cyclo-hexadien-on-1	3,240	15,5	12,5	1,00	0,81
	2,870		12,0		0,77
4-tert. Butyl-4-acetoxy-cyclo-hexadien-on-1	2,640	13,5	4,4	1,00	0,33
	2,270		3,1		0,23
Progesteron	2,924	17,8	13,1	2,00	1,47
	3,247		12,2		1,37
Isobutyraldehyd	2,665	38,8	20,2	1,00	0,52
	1,435		22,7		0,59
Acetylbenzoylmethan	3,020	34,6	7,0	2,00	0,40
	4,421		5,8		0,34
Aceton	4,657	48,2	29,8	1,00	0,62
	3,602		31,1		0,65
Campher	5,110	18,4	1,4	1,00	0,08
	4,500		1,4		0,08
Citronellal	2,455	18,4	3,5	1,00	0,19
	3,018		3,9		0,21
Chloralhydrat	4,548	16,9	4,2	1,00	0,25
	3,308		3,7		0,22
4-Keto-n-heptansäure	3,276	19,4	5,7	1,00	0,29
	3,055		4,6		0,24
5-Keto-n-dekancarbonsäure	2,780	15,0	11,0	1,00	0,73
	4,015		10,9		0,73
Citral	2,804	18,4	12,2	1,00	0,66*
	3,012		12,3		0,67*
4-Aceto-phenylessigsäure	2,360	15,7	5,9	1,00	0,38
	2,790		7,8		0,50*
4-Methyl-4-acetoxy-cyclo-hexadien-on-1	3,568	16,8	13,4	1,00	0,80
	4,270		11,4		0,68
2-Methyl-3-methylen-hepta-non-(6)	2,909	20,0	14,8	1,00	0,74
	4,902		15,2		0,76
Mit 4-Nitrophenylhydrazin bestimmt:					
Chloralhydrat	4,805	16,9	15,9	1,00	0,94
	4,566		16,2		0,96
Protocatechualdehyd	3,272	20,3	20,6	1,00	1,01
	2,874		20,5		1,01

(Fortsetzung der Tabelle 1.)

Substanz	mg Einwaage	% Carbonyl		Zahl der CO-Gruppen	
		berechnet	gefunden	berechnet	gefunden
Phthal-aldehydsäure	3,584	18,5	18,7	1,00	1,01
	3,273		18,6		1,01
Piperonal	3,474	18,6	18,3	1,00	0,98
	3,382		17,7		0,95
o-Nitrobenzaldehyd	4,529	18,5	17,3	1,00	0,94
	3,826		17,7		0,97
Cholestanon	3,170	7,3	7,1	1,00	0,97
	4,062		6,9		0,95
4-tert. Amyl-2,2-diacetoxy-cyclo-hexadien-on-1	4,630	10,5	8,6	1,00	0,82
	4,044		8,3		0,79
Monochloraceton	2,596	30,3	28,8	1,00	0,95
	3,914		28,3		0,93
Carvon	3,790	18,6	18,0	1,00	0,97
	2,568		18,5		0,99
α,α'-Dichloraceton	4,148	22,0	21,0	1,00	0,95
	4,285		21,1		0,96
Methyl-cyclo-pentandion-dicarbonsäure-diäthylester	3,482	21,8	20,7	2,00	1,90
	2,788		21,3		1,95
4-Oxymethyl-acetophenon	3,520	18,6	12,4	1,00	0,67
	3,848		12,7		0,68
4-Amino-acetophenon	3,145	20,7	0,0	1,00	0,00
Retenchinon	3,105	21,2	39,4	2,00	3,72
	3,270		38,3		3,61
Biliansäure	3,150	12,4	8,8	2,00	1,42
	4,424		8,2		1,32
Campher	3,587	18,4	0,0	1,00	0,00
Mit 2,4,6-Trinitrophenylhydrazin bestimmt:					
Piperonal	3,007	18,6	16,3	1,00	0,88
	3,588		16,2		0,87
d,l-4-Acetophenyl(3)-buttersäure	3,060	13,6	14,6	1,00	1,07
	3,137		14,0		1,03
Cholestanon	3,332	7,3	7,3	1,00	1,00
	3,072		7,7		1,05
Carvon	2,760	18,6	17,1	1,00	0,92
	2,826		16,5		0,89
p-Aceto-phenylessigsäure	2,788	15,7	13,8	1,00	0,88
	3,286		13,1		0,84
p-Nitrobenzaldehyd	3,135	18,5	16,3	1,00	0,88
	2,637		16,7		0,90

(Fortsetzung der Tabelle 1.)

Substanz	mg Einwaage	% Carbonyl		Zahl der CO-Gruppen	
		berechnet	gefunden	berechnet	gefunden
o-Nitrobenzaldehyd	4,945	18,5	6,1	1,00	0,33
	3,740		6,4		0,35
Phthal-aldehydsäure	4,220	18,5	3,8	1,00	0,21
	4,005		4,2		0,23
4-Keto-heptansäure	4,117	19,4	3,9	1,00	0,20
	3,866		4,0		0,21
Retenchinon	2,985	21,2	1,9	2,00	0,18
	2,688		2,8		0,26
2,4-Dimethyl-2-acetoxy-cyclo-hexadien-on-1	3,890	15,4	5,6	1,00	0,36
	4,336		6,2		0,40
Progesteron	4,252	17,8	10,9	2,00	1,23
	3,537		11,6		1,30

* Hydrazonbildung unter Erwärmung.

Wie aus Tabelle 1 zu entnehmen ist, kann eine große Anzahl carbonylgruppenhaltiger Verbindungen mit den verschiedenen Nitrophenylhydrazinen quantitativ auf ihren Carbonylgehalt untersucht werden. Der Vorteil dieser Methode liegt vor allem darin, daß sie nicht auf ein Reagens beschränkt ist. Am besten geeignet erwies sich für die quantitative Umsetzung zum Hydrazon das 2,4-Dinitrophenylhydrazin. Einzelne Verbindungen reagierten jedoch mit diesem Reagens nicht oder nur unvollkommen, wie z. B. Monochloraceton, α,α'-Dichloraceton, ferner Chloralhydrat, Methyl-cyclo-pentadion-dicarbonsäure-diäthylester. Bei diesen Verbindungen gelang aber die Bestimmung der Carbonylgruppen unter Verwendung von 4-Nitrophenylhydrazin. Die Anwendung von 2,4,6-Trinitrophenylhydrazin ist auf eine viel geringere Zahl von Carbonylverbindungen beschränkt. Einzelne Carbonylverbindungen reagierten mit keinem der drei Phenylhydrazine, wie z. B. Citral, Campher. Für das Ausbleiben der quantitativen Bildung des Hydrazons sind verschiedene Umstände maßgebend: Zunächst eine gewisse Löslichkeit des betreffenden Hydrazons in der etwa 10^{0}_{0}igen alkoholischen Salzsäurelösung des Reagens, wie experimentell bei verschiedenen Hydrazonen festgestellt wurde; ferner strukturelle Besonderheiten der Verbindungen (sterische Hinderung). Bei den untersuchten Diketonen konnte durch Bestimmung in der Kälte stets nur eine Carbonylgruppe erfaßt werden, weil das entstandene Monohydrazon sofort ausfiel und so der weiteren Umsetzung entzogen wurde. In einigen Fällen konnte die Reaktion dadurch weitergeführt werden, daß die Substanz unter Verwendung größerer Mengen Alkohols mit dem Reagens unter Rückfluß gekocht wurde. Trotzdem

konnte bei Benzil, Dibenzoylmethan und Dibenzoylacetylmethan statt zwei bzw. drei Carbonylgruppen nur je eine Gruppe gefunden werden. Im allgemeinen ist also die Anwendung von 2,4-Dinitrophenylhydrazin zu empfehlen und erst, wenn mit diesem Reagens keine eindeutigen oder überhaupt keine Resultate erhalten werden, wird man 4-Nitrophenylhydrazin oder auch 2,4,6-Trinitrophenylhydrazin versuchen*.

Tabelle 2.

Substanz	Berechnet	Zahl der Carbonylgruppen		
		mit 4-Nitrophenylhydrazin gefunden	mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin gefunden	mit 2,4,6-Trinitrophenylhydrazin gefunden
Piperonal	1	0,96	0,97	0,88
Carvon	1	0,98	0,99	0,91
Phthal-aldehydsäure	1	1,01	0,98	0,22
o-Nitrobenzaldehyd	1	0,95	1,01	0,34
Retenchinon	2	3,67	0,95	0,22
Protocatechualdehyd	1	1,01	0,99	
4-tert. Amyl-2,2-diacetoxy-cyclohexadien-on-1	1	0,80	1,00	
Chloralhydrat	1	0,95	0,24	
4-Oxymethylacetophenon	1	0,68	0,97	
Methylcyclopentadion-dicarbonsäure-diäthylester	2	1,93	0,98	
Biliansäure	2	1,37	1,03	
Kampfer	1	0,00	0,08	
p-Nitrobenzaldehyd	1		0,98	0,89
4-Acetophenylessigsäure	1		0,50	0,86
2,4-Dimethyl-2-acetoxy-cyclohexadien-on-1	1		0,79	0,38
4-Ketoheptansäure	1		0,27	0,20
Progesteron	2		1,42	1,27
Cholestanon	1	0,96		1,03

Ein Vergleich zwischen den mit dieser Methode erhaltenen Resultaten und solchen, die nach der Methode von *Strache-Falkenhausen* ermittelt wurden, der die Überlegenheit der beschriebenen Methode deutlich veranschaulicht, wurde bereits an anderer Stelle veröffentlicht[38].

II. Die indirekte Bestimmung von Carbonylgruppen.

Obwohl die Bestimmung der Carbonylgruppen mit nitrosubstituierten Hydrazinen bei einer großen Anzahl von aromatischen Aldehyden, ein-

* Für die Überlassung von zahlreichen Substanzen sei auch an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. *F. Wessely*, II. Chemisches Laboratorium der Universität Wien, Herrn Prof. Dr. *R. Fischer*, Pharmakognostisches Institut der Universität Graz und Herrn Dir. Dr. *M. Stoll*, Fa. Firmenich & Cie., Genf, herzlichst gedankt.

fach gebauten Phenonen und Steroidketonen weitaus bessere Ergebnisse liefert als das Verfahren nach *Strache-Falkenhausen*[17], ist sie doch nicht allgemein anwendbar; denn nicht alle carbonylgruppenhaltigen Verbindungen reagieren quantitativ mit nitrosubstituierten Hydrazinen. Die Zahl der Carbonylgruppen läßt sich dann aber auf indirektem Wege mikroanalytisch ermitteln, sofern ein Hydrazon in kristallisierter Form isolierbar ist.

Durch einen Vorversuch wird festgestellt, welches Phenylhydrazin für die Hydrazonbildung am geeignetsten ist. Dieses Phenylhydrazin wird dann zur Kondensation verwendet und das erhaltene Hydrazon analysenrein dargestellt. Davon wird eine Stickstoffbestimmung nach *Dumas-Pregl* durchgeführt. Daraus läßt sich die Carbonylzahl berechnen. Ist die carbonylgruppenhaltige Substanz selbst stickstoffhaltig, so muß außer der Bestimmung des Stickstoffes im Hydrazon auch die Bestimmung des Stickstoffes in der ursprünglichen Substanz durchgeführt werden. Aus diesen beiden Werten läßt sich die Carbonylzahl berechnen.

Berechnung.

a) Für Substanzen ohne Eigenstickstoff:

$$\% \text{ CO} = \frac{\text{mg N}_2 \cdot f \cdot 100}{E - \text{mg N}_2 \cdot F};$$

b) für Substanzen mit Eigenstickstoff:

$$\% \text{ CO} = \frac{(\text{mg N}_2 - \text{mg N}_2') \cdot f \cdot 100}{E - (\text{mg N}_2 - \text{mg N}_2') \cdot F}.$$

E = mg Hydrazon,
mg N_2 = Stickstoffgehalt des Hydrazons,
mg N_2' = Stickstoffgehalt der ursprünglichen Substanz.

Faktoren:

a) für Phenylhydrazin:
$f = 0{,}9998$ $\log f = 99990$ $F = 3{,}217$ $\log F = 50740$,

b) für p-Nitrophenylhydrazin:
$f = 0{,}6666$ $\log f = 82385$ $F = 3{,}216$ $\log F = 50730$,

c) für 2,4-Dinitrophenylhydrazin:
$f = 0{,}4999$ $\log f = 69889$ $F = 3{,}215$ $\log F = 50719$.

Zusammenfassung.

Es wird eine Carbonylgruppenbestimmung beschrieben, wonach die zu untersuchende Substanz mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin bzw. mit 4-Nitrophenylhydrazin oder auch mit 2,4,6-Trinitrophenylhydrazin zu den entsprechenden Hydrazonen kondensiert wird. Das nicht zur Hydrazonbildung verbrauchte Nitrophenylhydrazin wird mit Titantrichlorid reduziert und das überschüssige Titantrichlorid mit Eisen-III-Ammoniumsulfat maßanalytisch erfaßt.

Im Falle als die quantitative Umsetzung zum Hydrazon nicht gelingt, läßt sich durch die Stickstoffbestimmung im analysenrein dargestellten Hydrazon die Zahl der Carbonylgruppen berechnen.

Summary.

A description of a carbonyl group determination is given. In this the material being studied is condensed to the corresponding hydrazones by means of 2,4-dinitrophenylhydrazine or 4-nitrophenylhydrazine or of 2,4,6-trinitrophenylhydrazine. The unconsumed nitrophenylhydrazine is reduced with titanous chloride and the excess of the latter is determined volumetrically by ferric ammonium sulfate.

In case the quantitative transformation is not successful, the number of carbonyl groups can be calculated from the nitrogen content of the pure hydrazone that has been prepared by the given procedure.

Résumé.

On décrit un dosage du groupement carbonyle d'après lequel la substance expérimentée est condensée avec la dinitro-2,4 phénylhydrazine ou la nitro-4 phénylhydrazine ou avec la trinitro-2,4,6 phénylhydrazine en les hydrazones correspondantes. La nitro-phénylhydrazine non utilisée pour la formation d'hydrazone est réduite par le trichlorure de titane et l'excès de ce dernier est évalué volumétriquement par l'alun ferrique ammoniacal. Dans le cas où la transformation quantitative en hydrazone n'a pas lieu, on calcule le nombre de groupements carbonyles par dosage d'azote dans l'hydrazone préparée à l'état de pureté pour l'analyse.

Literatur.

[1] *J. Hanus*, Z. Unters. Nahrungs- u. Genußmittel **3**, 531 (1900).
[2] *E. Simon* und *C. Neuberg*, Biochem. Z. **232**, 479 (1931).
[3] *C. Torres* und *S. Brosa*, An. soc. españ. física quím. **31**, 34 (1931).
[4] *R. E. Houghton*, Amer. J. Pharmac. **106**, 62 (1934).
[5] *H. A. Iddles* und *C. E. Jackson*, Ind. Eng. Chem., Analyt. Ed. **6**, 454 (1934).
[6] *O. Fernandez*, *L. Socias* und *C. Torres*, An. soc. españ. física quím. **30**, 37 (1932).
[7] *H. A. Iddles*, *A. W. Low*, *B. D. Rosen* und *R. T. Hart*, Ind. Eng. Chem., Analyt. Ed. **11**, 102 (1939).
[8] *G. W. Perkins* und *M. W. Edwards*, Amer. J. Pharmac. **107**, 208 (1935).
[9] *H. B. Hughes*, J. Biol. Chem. **140**, 21 (1941).
[10] *F. P. Clift* und *R. Percival*, Biochemic. J. **26**, 1788 (1932).
[11] *G. Romeo* und *E. D'Amico*, Ann. chim. applicata **15**, 320 (1925).
[12] *E. v. Meyer*, J. prakt. Chem. (2) **36**, 115 (1887).
[13] *H. Strache*, Mh. Chem. **12**, 524 (1891); **13**, 299 (1892); **13**, 316 (1892); **14**, 270 (1893).
[14] *E. Riegler*, Z. analyt. Chem. **40**, 94 (1901).
[15] *W. Smith* jun., Chem. News **93**, 83 (1906).
[16] *W. G. Ellis*, J. Chem. Soc. London **128**, 844 (1927).
[17] *F. v. Falkenhausen*, Z. analyt. Chem. **99**, 241 (1934).
[18] *W. Schöniger* und *H. Lieb*, Mikrochem. **38**, 165 (1951).
[19] *E. G. R. Ardagh* und *J. G. Williams*, J. Amer. Chem. Soc. **47**, 2983 (1925).

[20] *A. E. Light*, Ind. Eng. Chem., Analyt. Ed. **14**, 42 (1942).
[21] *P. Petrenko-Kritschenko* und *S. Lordkipanidze*, Ber. dtsch. chem. Ges. **34**, 1702 (1901).
[22] *R. C. Stillmann* und *R. M. Reed*, Perfum. Essent. Oil Rec. **23**, 278 (1931).
[23] *H. Schultes*, Angew. Chem. **47**, 258 (1934).
[24] *D. M. Smith* und *J. Mitchell* jun., Analyt. Chemistry **22**, 750 (1950).
[25] *A. Eitel*, J. prakt. Chem. **159**, 292 (1942).
[26] *A. Reclaire* und *R. Frank*, Perfum. Essent. Oil Rec. **29**, 212 (1937).
[27] *L. Palfray* und *S. Tallard*, C. r. acad. sci., Paris **199**, 296 (1934).
[28] *E. Diding* und *H. Hellberg*, Farmaceutisk Revy **47**, 109 (1948).
[29] *W. M. D. Bryant* und *D. M. Smith*, J. Amer. Chem. Soc. **57**, 57 (1935).
[30] *R. E. Meyer*, Dtsch. Parfüm-Ztg. **19**, 3 (1933).
[31] *G. Gorbach*, Fette u. Seifen **52**, 405 (1950).
[32] *P. Langlais* und *L. J. Bollinger*, Ind. parfumerie **2**, 251 (1947).
[33] *E. W. Dean* und *D. D. Stark*, Ind. Eng. Chem. **12**, 486 (1920).
[34] *J. Mitchell* jun., *D. M. Smith* und *W. M. D. Bryant*, J. Amer. Chem. Soc. **63**, 573 (1941).
[35] *G. B. L. Smith* und *T. G. Wheat*, Ind. Eng. Chem., Analyt. Ed. **11**, 200 (1939).
[36] *St. Veibel*, Bull. soc. chim. France (4) **41**, 1410 (1927).
[37] *R. P. Hobson*, J. Chem. Soc. London **130**, 1384 (1929).
[38] *W. Schöniger* und *H. Lieb*, Z. analyt. Chem. **134**, 188 (1951).

Buchbesprechungen.

F. D. Rossini, K. S. Pitzer, R. L. Arnett, R. M. Braun, G. C. Pimentel et al.: **Selected Values of Physical and Thermodynamic Properties of Hydrocarbons and Related Compounds.** (Comprising the Tables of the American Petroleum Institute Research Project 44 extant as of December 31, 1952.) IX, 1050 S. Pittsburgh (Pa.): Carnegie Press, Carnegie Institute of Technology. 1953. Geb. $ 7,—.

Zehn Jahre lang arbeitete das Team der Verfasser an der Darstellung und Feinreinigung organischer Verbindungen, die für die Petroleumindustrie Bedeutung haben, an der Bestimmung der Konstanten dieser Stoffe und an der kritischen Sichtung des Literaturmaterials. Im vorliegenden Bande sind die Ergebnisse dieser Bemühungen systematisch geordnet niedergelegt.

Statt eines Registers findet man auf S. VII und VIII eine Tabelle, die den sehr unterschiedlichen Umfang der einzelnen Beiträge und eine Verschlüsselung nach den behandelten Körperklassen, die durch Zahlen versinnbildlicht sind, und den zugehörigen Eigenschaften, denen Buchstabensymbole zukommen, mit leider sehr kleinem Druck enthält. Die hier eingehaltene Reihenfolge stimmt zwar bei den Buchstaben mit der alphabetischen überein, dagegen sind die angewandten Zahlen in einer ungewöhnlichen Art angeordnet, beginnend mit 00, 0, 20, 1, 2, 3, 4, 17, 22, 6 usw. Dies mag historische Gründe haben, praktisch ist es wohl nicht.

Die Konstanten, die man im vorliegenden Werk findet, sind Siedepunkt und seine Druckabhängigkeit, Brechungsexponent und Dichte, Schmelzpunkt, Molvolumen, Mol- und spezifische Refraktion, der relativ neue, zusammengesetzte Begriff des Refractivity Intercept, der offenbar steigende Bedeutung erlangt hat, spezifische Dispersion, Viskositätsdaten, kritische Konstanten, Oberflächenspannung, Schmelz-, Bildungs- und Verdampfungsenthalpien, Entropien, freie Energien, kryoskopische Konstanten, Wärmeinhalt und -kapazität, Gleichgewichtskonstanten und andere mehr; vorgesehen, aber nicht aufgenommen sind ferner Eigenschaften, die mit P, V, T verknüpft sind.

Die Stoffauswahl ist weniger umfassend. Entsprechend den Interessen der Erdölforschung sind im vorliegenden Bande Kohlenwasserstoffe im Vordergrunde, gesättigte (normale bis C_{40}, andere nur bis C_{10}), mono- und diolefinische, gewisse Acetylene, naphthenische, aromatische und gemischte Typen; ferner findet man Mercaptane, die in die genannten Verbindungsklassen passen, Thioäther (als Thia-alkane bezeichnet) und andere Verbindungen mit zweiwertigem Schwefel. Die an sich vorgesehene Ausdehnung des Werkes auf Sauerstoffverbindungen (Alkohole, Oxo-verbindungen u. a.), auf einfache Stickstoff- und Halogenverbindungen bleibt offenbar der Zukunft vorbehalten. Für die dem Erdöl fernerstehenden Leser bleibt das Buch also sehr oft die Antwort noch schuldig. Aufgenommen sind dagegen Stoffe, wie O_2, H_2, CO usw., deren große Bedeutung offenkundig ist.

Vielen Tabellen, die zunächst im metrischen System abgedruckt wurden, folgt die auf englische Maßeinheiten umgerechnete (oder vielleicht neu bestimmte) Tabelle; immerhin ist das Vorangehen der metrischen Tabelle als ein Anzeichen aufzufassen, daß das metrische System wohl auch auf diesem konservativen Sektor ernsthaft Eingang gefunden hat.

Das Werk wird fortgesetzt, und zwar durch lose Ergänzungsblattkarten im Format des Buches, die sogar an Hochschul- und Forschungsinstitute kostenlos abgegeben werden. Vorgesehen sind auch Lochkarten im Hollerithsystem und die Aufnahme von Infrarot-, Ultraviolett- und Massenspektren, die im Buche selbst noch fehlen.

Zum Unterschiede von ähnlichen Büchern sind hier kritisch gesichtete, vielfach auch auf eigene Arbeit zurückgehende Werte vorhanden, es ist jeweils also nur *ein* Wert gegeben, während man sonst meist eine ganze Anzahl mit den in den Originalen vorhandenen Abweichungen zwischen Bestimmungen verschiedener Autoren abgedruckt findet. Die aufgenommenen Werte sollen untereinander verträglich sein. In diesem Sinne darf man hoffen, die endgültigen Konstanten vorzufinden.

Der innere Wert eines Tabellenwerkes liegt natürlich in seiner Verläßlichkeit. Eine kurze Überprüfung ließ keine Fehler erkennen.

Durch die Verwendung des in Europa noch selten verwendeten Varityper-Verfahrens, das sehr sauber angewandt ist, konnte der Preis des Werkes erstaunlich niedrig gehalten werden, so daß es einem größeren Leserkreise zur Verfügung stehen wird. Nach seiner Erweiterung auf höhere Kohlenwasserstoffe und Stoffe anderer Körperklassen wird es noch sehr an Interesse für Benützer außerhalb des Fragenkreises der Erdölchemie gewinnen, dieser selbst aber ist es schon heute ein überaus wichtiger Behelf zur schnellsten Auffindung der heute gültigen, besten Konstanten. *F. Kuffner*-Wien.

Ph. W. West, M. M. Vick and *A. L. LeRosen:* **Qualitative Analysis and Analytical Chemical Separations.** XII, 223 S. New York: Macmillan Company. 1953. $ 3,75.

Die bekannten Autoren legen ein Lehr- und Übungsbuch für die qualitative anorganische Analyse vor, das im 1. Teil moderne Nachweis- und Trennungsmethoden, im 2. Teil die theoretischen Grundlagen der qualitativen Analytik in einer Form bringt, wie sie den Bedürfnissen des Unterrichtes in den Vereinigten Staaten entspricht. Der Schwefelwasserstoffgang ist durch eine in mancher Hinsicht schärfere und bessere Gruppentrennung ersetzt, wobei die Kationen in eine „lösliche Gruppe" (Na, K, NH_4) ohne gemeinsames Gruppenreagens, eine „Chloridgruppe" (Hg^+, Ag), eine „basische Benzoatgruppe" (Sn^{4+}, Sb, Bi, Fe^{3+}, Al, Cr^{3+}) mit heißer Benzoatlösung bei p_H 3 bis 4 als Gruppenreagens, eine „Fluoridgruppe" (Mg, Ba, Sr, Ca) mit Bleifluorid als Reagens, eine „Hydroxydgruppe" (Mn^{2+}, Fe^{2+}, Hg^{2+}, Cu, Co, Ni, Cd) und eine „amphotere Gruppe" (Sn^{2+}, Zn, As) getrennt werden. Auch für die Analyse der Anionen wird ein neues Schema empfohlen, das auf der Basis sogenannter „Ausschließungsreaktionen" arbeitet. Ihrer für die moderne Analytik gegebenen Wichtigkeit entsprechend werden besonders die Komplexverbindungen im 2. Teil ausführlich behandelt.

Das Buch wird ohne Zweifel von den Studierenden als willkommene Bereicherung des analytischen Schrifttums begrüßt werden, zumal es zur Vertiefung des Verständnisses der im Laboratorium geübten Reaktionen beiträgt. Bei einer Neuauflage wären nach Ansicht des Referenten auch andere wichtige Elemente wie Mo, W, Si, Au usw. zu berücksichtigen.

H. Malissa-Düsseldorf.

Herausgeber und Eigentümer: Springer-Verlag in Wien, I., Mölkerbastei 5. — Für den Inhalt verantwortlich: Prof. Dr. *Michael Karl Zacherl*, Wien, XIX., Chimanistraße 21.
Druck: Manzsche Buchdruckerei, Wien, IX., Lustkandlgasse 52.